

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecké fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Miroslav Příbyl

Objasnění vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace nezávislé na čepičce

Elucidation of ERK1 and ERK2 protein kinases effect on cap-independent translation
initiation

Diplomová práce

Školitel: Mgr. Václav Vopálenský, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15.8.2016

.....

Miroslav Příbyl

Poděkování

Zde bych rád poděkoval všem lidem, kteří mi pomohli během mého studia, výzkumu a při psaní této práce. Rád bych poděkoval svému školiteli Mgr. Václavu Vopálenskému, PhD. za jeho rady a zkušenosti, které mi předal během práce v laboratoři a za jeho nekonečnou trpělivost. Rád bych poděkoval RNDr. Martinu Pospíškovi, PhD. za to, že mi poskytl zázemí v jeho laboratoři a nechal mě zde pracovat na mém tématu. Rád bych poděkoval členům Laboratoře biochemie RNA, za to jakými mi jsou přáteli a za jejich neocenitelné rady. V neposlední řadě bych rád za vše poděkoval Janě Kráčmarové. Dále bych rád poděkoval mojí rodině za jejich pomoc, podporu a trpělivost, kterou projevovali během mého studia a práce v laboratoři.

Abstrakt

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou jedny z nejstudovanějších proteinů buněčné signalizace. Oba proteiny se podílejí na velkém množství procesů ať už fosforylací proteinových substrátů nebo aktivací proteinkináz, které jsou součástí dalších signálních drah. Enzymy ERK1 a ERK2 jsou součástí MAPK/ERK signální kaskády, která je spojována s mnoha buněčnými ději, jakými jsou například buněčná proliferace, buněčný růst nebo diferenciace. Signální kaskáda MAPK/ERK je často silně aktivována v různých typech rakovinných bujení a je jedním z cílů vývoje nízkomolekulárních inhibitorů v léčbě nádorových onemocnění.

Jednou z hlavních otázek základního výzkumu proteinů ERK1 a ERK2 je rozdílnost obou proteinkináz. Přestože mnohé poznatky poukazují na redundanci těchto proteinů, objevují se i poznatky tvrdící opak. Nedávná publikace skupiny Casanova *et al.* 2012 nepřímo poukazuje na rozdílný vliv proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace, která není závislá na čepičce, nýbrž na vnitřním vazebném místě pro ribozom, IRES.

V Laboratoři biochemie RNA se už dlouho zabýváme iniciací translace zprostředkovanou HCV IRES (z ang. Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site, Vnitřní vazebné místo pro ribozomu viru žloutenky typu C). Tato diplomová práce vedla k zavedení metody RNA interference v naší laboratoři a vytvoření reportérového systému pro studium vlivu proteinů ERK1 a ERK2 na iniciaci translace pomocí HCV IRES. Na základě dat získaných naším výzkumem prezentujeme v této práci výsledky, které popisují vliv enzymů ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES. Dle našich výsledků usuzujeme, že jsou enzymy ERK1 a ERK2 pozitivními regulátory iniciace translace závislé na HCV IRES, a chovají v tomto procesu redundantně. Protein ERK2 má výraznější vliv na pozorovaný jev, což koresponduje s vnitrobuněčným zastoupením proteinu a jeho poměru vůči ERK1.

Klíčová slova: ERK1, ERK2, MAPK/ERK, HCV IRES, translace, RNA interference, siRNA.

Abstract

Protein kinases ERK1 and ERK2 are one of the most studied proteins in cell signalling. Both proteins are involved in a plethora of processes, such as phosphorylation and activation of kinases as part of signalling pathways. Enzymes ERK1 and ERK2 are part of MAPK/ERK signalling cascade, connected to many cellular including cell proliferation, cell growth or differentiation. The MAPK/ERK signalling cascade is often activated in different types of tumors, making it a candidate for developing new chemical inhibitors.

One of the important questions in fundamental research of ERK1 and ERK2 protein kinases is the search for difference between these proteins. Current knowledge points to redundancy of both proteins, however several examples suggest otherwise. Recently, the work presented in Casanova *et al.* 2012 indirectly suggests divergent effect of ERK1 and ERK2 on cap-independent translation initiation.

In the Laboratory of RNA biochemistry we focus on HCV IRES (Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site) dependent translation initiation. This diploma thesis lead to establish RNA interference method in our laboratory and to establish reporter system to study ERK1 and ERK2 effect on HCV IRES dependent translation initiation. Based on our data acquired during our research, we present in this work results describing effect of ERK1 and ERK2 on HCV IRES dependent translation initiation. We conclude that ERK1 and ERK2 are both positive regulators of HCV IRES dependent translation initiation, thus ERK1 and ERK2 act redundantly in the regulation of this process. Protein ERK2 is stronger positive regulator of observed phenomenon than ERK1. This corresponds with intracellular ratio of ERK1 and ERK2.

Key words: ERK1, ERK2, MAPK/ERK, HCV IRES, translation, RNA interference, siRNA.

Obsah	
Abstrakt	5
Abstract	6
Obsah	7
Seznam zkratek	11
1 Úvod	14
2 Cíle práce	15
3 Přehled literatury	16
3.1 RNA interference	16
3.2 Signalizace a MAPK/ERK signální kaskáda	20
3.3 Rozdílnost a redundance proteinkináz ERK1 a ERK2	24
3.4 Iniciace translace u eukaryot	28
3.5 Iniciace translace zprostředkovaná HCV IRES	31
3.6 Metody studia IRES	34
3.7 MAPK/ERK kaskáda a regulace translace	36
4 Materiály a metody	39
4.1 Materiály	39
4.1.1 Chemikálie	39
4.1.2 Roztoky	40
4.1.3 Komerční pufrý a roztoky	41
4.1.4 Komerční soupravy	42
4.1.5 Enzymy	42
4.1.6 Protilátky	42
4.1.7 siRNA	43
4.1.8 Vektory	43
4.1.9 Oligonukleotidové primery	46
4.1.10 Bakteriální kmeny	46

4.1.11	Buněčné linie.....	46
4.1.12	Kultivační média a chemikálie	47
4.1.13	Transfekční činidla	47
4.1.14	Standardy molekulových hmotností	47
4.2	Metody	47
4.2.1	Práce s mikroorganismy	47
4.2.1.1	Transformace buněk <i>E.coli</i> metodou elektroporace.....	47
4.2.2	Práce s buněčnými liniemi.....	48
4.2.2.1	Kultivace buněčných linií.....	48
4.2.2.2	Pasážování buněčných linií.....	48
4.2.2.3	Skladování buněčných kultur	49
4.2.2.4	Příprava pro transfekci buněčných linií	50
4.2.2.5	Transfekce buněčné linie molekulami DNA.....	50
4.2.2.6	Transfekce buněčné linie molekulami RNA.....	51
4.2.2.7	Transfekce buněčné linie siRNA	52
4.2.2.8	Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií	54
4.2.2.8.1	Flp-In™ System a Flp-In™ T-REx™ Cell Line.....	54
4.2.2.8.2	Příprava stabilních buněčných linií pomocí <i>Flp-In™ System a Flp-In™ T-REx™ Cell Line</i>	55
4.2.3	Práce s DNA.....	56
4.2.3.1	Izolace vektorů z buněk <i>E.coli</i> XL-1 <i>Blue</i> pomocí komerční soupravy <i>Plasmid extraction Mini Kit™ (FavorPrep™)</i>	56
4.2.3.2	Izolace vektorů z bakteriální kultur bez endotoxinů.....	57
4.2.3.3	Měření koncentrace DNA pomocí NanoDrop® ND-1000 <i>Spectrophotometer</i>	58
4.2.3.4	Přečištění vzorku DNA.....	59
4.2.3.5	Klonování DNA	60
4.2.3.6	PCR	60

4.2.3.7	Úprava konců ampliconů před klonováním DNA pomocí komerční soupravy <i>TOPO® TA Cloning® Kit</i>	60
4.2.3.8	Klonování DNA komerční soupravou <i>TOPO® TA Cloning® Kit</i>	61
4.2.3.9	Štěpení DNA restrikčními endonukleázami	62
4.2.3.10	Dvojité štěpení DNA restrikčními endonukleázami	62
4.2.3.11	Agarózová elektroforéza DNA	62
4.2.3.12	Sekvenace DNA	63
4.2.4	Práce s RNA	63
4.2.4.1	Agarosová elektroforéza RNA	63
4.2.4.2	Linearizace vektorů pro <i>in vitro</i> transkripci	64
4.2.4.3	<i>In vitro</i> transkripce	64
4.2.4.3.1	Standardní <i>in vitro</i> transkripční reakce	64
4.2.4.3.2	<i>In vitro</i> transkripční reakce s analogem čepičky	65
4.2.4.3.3	Degradace DNA ve vzorku <i>in vitro</i> transkripce	67
4.2.4.4	RT-qPCR	67
4.2.4.4.1	Reverzní transkripce	67
4.2.4.4.2	qPCR	69
4.2.5	Práce s proteiny	69
4.2.5.1	<i>In vitro</i> translace	69
4.2.5.2	Lýze buněk a příprava vzorku pro BCA a <i>western blot</i>	70
4.2.5.3	Měření koncentrace proteinů metodou BCA	70
4.2.5.4	Gelová elektroforéza SDS-PAAGE	71
4.2.5.5	Western blot	72
4.2.5.6	Imunodetekce	73
4.2.5.7	Strippování membrán	73
4.2.5.8	Duální luciferázový test	74
4.2.6	Statistická analýza dat	75

5	Výsledky	76
5.1	Buněčná linie pro zavedení metody RNA interference	76
5.2	Zavedení metody RNA interference pomocí siRNA	78
5.2.1	miRNA-like efekt	83
5.3	Příprava stabilních buněčných linií	87
5.4	Příprava reportérového systému, <i>in vitro</i> transkripce	87
5.4.1	Příprava templátu pro <i>in vitro</i> transkripci	87
5.4.2	Sekvenování reportérových kazet a příprava zásobních vzorků	90
5.4.3	Příprava molekul RNA metodou <i>in vitro</i> transkripce	94
5.4.4	Test funkčnosti luciferáz	97
5.4.5	Transfekce buněčné linie molekulami RNA připravenými metodou <i>in vitro</i> transkripce	98
5.5	Příprava reportérového systému, transientní transfekce	100
5.5.1	Transientní transfekce buněčné linie HEK 293 a použité vektory	100
5.5.2	Transientní transfekce buněčné linie HEK 293 reportérovými vektory a umlčení proteinkináz ERK1 a ERK2	103
5.5.2.1	Poměr aktivit luciferáz	108
6	Diskuze	110
7	Souhrn	115
8	Seznam použité literatury	116

Seznam zkratek

AP-1	Activator protein 1	Aktivační protein 1
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
EGFR	Epidermal growth factor receptor	Receptor epidermálního růstového faktoru
FG repetece	Phenylalanin-glycin repeats	Fenylalanin-glycinové repetece
Flp	Flippase	Flipáza
FRT	Flippase recognition target	Cíl rozpoznávaný Flipázou
GTP	Guanosine nucleotide triphosphate	Guanosin nukleotid trifosfát
kDa	Kilodalton $1,66 \times 10^{-24}$ kg	Kilodalton $1,66 \times 10^{-24}$ kg
MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1	Mitogenem aktivovaná proteinináza 1
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	Mitogenem aktivovaná proteinináza 3
mRNA	messenger RNA	mediátorová RNA
PAAGE	Polyacrylamid gel electrophoresis	Polyakrylamidová elektroforéza
PCR	Polymerase Chain Reaction	Polymerázová řetězová reakce
Pwo	<i>Pyrococcus woesei</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
qPCR	quantitative PCR	kvantitativní PCR
rRNA	ribosomal RNA	ribosomální RNA
RT	Reverse transcription	Reverzní transkripce
SH2	Src homology 2	Src homologie 2
Taq	<i>Thermus aquitaticus</i>	<i>Thermus aquitaticus</i>
tRNA	transfer RNA	transferová RNA
tRNAi	transfer RNA initiator	iniciátorová tRNA

UTR	Untranslated region	Nepřekládaná oblast
-----	---------------------	---------------------

Zkratky aminokyselin a nukleotidů:

D	Asp	Aspartic acid	Kyselina asparagová
E	Glu	Glutamic acid	Kyselina glutamová
F	Phe	Phenylalanine	Fenylalanin
G	Gly	Glycine	Glycin
H	His	Histidine	Histidin
I	Iso	Isoleucine	Isoleucin
K	Lys	Lysine	Lysin
L	Leu	Leucine	Leucin
M	Met	Methionine	Metionin
N	Asn	Asparagine	Asparagin
P	Pro	Proline	Prolin
Q	Gln	Glutamine	Glutamin
R	Arg	Arginine	Arginin
S	Ser	Serine	Serin
T	Thr	Threonine	Treonin
V	Val	Valine	Valin
W	Trp	Tryptophane	Tryptofan
Y	Tyr	Tyrosine	Tyrosin
X	Xxx	Any aminoacid residue	Jakýkoliv aminokyselinový zbytek

A	Adenine	Adenin
C	Cytosine	Cytosin
G	Guanine	Guanin
T	Thymine	Tymin
V	Any nucleotide but T	Jakýkoliv nukleotid kromě T

1 Úvod

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou součástí signální kaskády označované jako MAPK/ERK. Jedná se o signální dráhu zapojenou v mnoha vnitrobuněčných dějích, jakými jsou buněčná proliferace nebo buněčný růst. I proto je aktivita této kaskády a tudíž proteinů ERK1 a ERK2, sledována ve vztahu s jinými ději.

V roce 2012 publikovala skupina okolo doktora Christiana Thoma výsledky své práce týkající se testování vlivu proteinkináz a fosfatáz pomocí siRNA na iniciaci translace, která je nezávislá na čepičce. Tato práce poukazuje na rozdílné role proteinů ERK1 a ERK2 na iniciaci translace mRNA závislé na elementu, který dokáže iniciovat translaci bez čepičky, tzv. buněčné IRES. Během svého nepublikovaného výzkumu tato skupina testovala, jaký mají enzymy ERK1 a ERK2 vliv na iniciaci translace iniciovanou vnitřním vazebným místem pro ribozom žloutenky typu C, HCV IRES. Vzhledem k tomu, že se toto téma liší od toho, co skupina Dr. Thoma studovala v době publikování původní práce, nás dr. Thoma kontaktoval a informoval o jejich pokroku v tomto poli. Dle jejich nepublikovaných výsledků se proteinkináza ERK2 chovala jako negativní regulátor iniciace translace závislé na HCV IRES. Na základě těchto informací a dat z původního článku této skupiny, jsme se rozhodli prohloubit znalosti v tomto tématu.

Pro naši laboratoř to znamenalo, osvojení nových přístupů. Bylo potřeba zavést metodu RNA interference, která do tehdejší doby nebyla v Laboratoři biochemie RNA nikdy použita. Dále bylo potřeba vytvořit reportérový systém, na kterém by se změny v hladině proteinu ERK1, respektive ERK2 daly pozorovat spolu se změnou v translaci závislé na čepičce, respektive HCV IRES. Celá práce pak měla být zakončena experimentálním spojením obou výše zmíněných metodik a analýzou získaných dat se závěrem, jaký je vliv proteinkinázy ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES.

2 Cíle práce

Hlavním cílem této práce je objasnit vliv proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace, která je závislá na vnitřním vazebném místu pro ribozom (IRES) z viru hepatitidy typu C (HCV). K dosažení tohoto cíle je potřeba etablovat metodu, která v Laboratoři biochemie RNA doposud nebyla používána, jedná se o RNA interferenci pomocí siRNA (*short interfering RNA*).

Zavedení RNA interference pomocí siRNA:

- Připravit a otestovat metodický postup s navrženými molekulami siRNA.
- Vybrat vhodný model pro experimentální studium iniciace translace závislé na HCV IRES.
- Použít RNA interferenci k objasnění vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES.

Objasnění vlivu ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES.

- Vytvořit stabilní line se začleněnou reportérovou kazetou, případně použít alternativní systém pro testování vlivu ERK1 a ERK2 na iniciaci translace zprostředkovanou HCV IRES.
- Využít modelového systému společně s RNA interferencí uvedenou pomocí siRNA k objasnění vlivu ERK1, respektive ERK2 na iniciaci translace, která je závislá na HCV IRES.

3 Přehled literatury

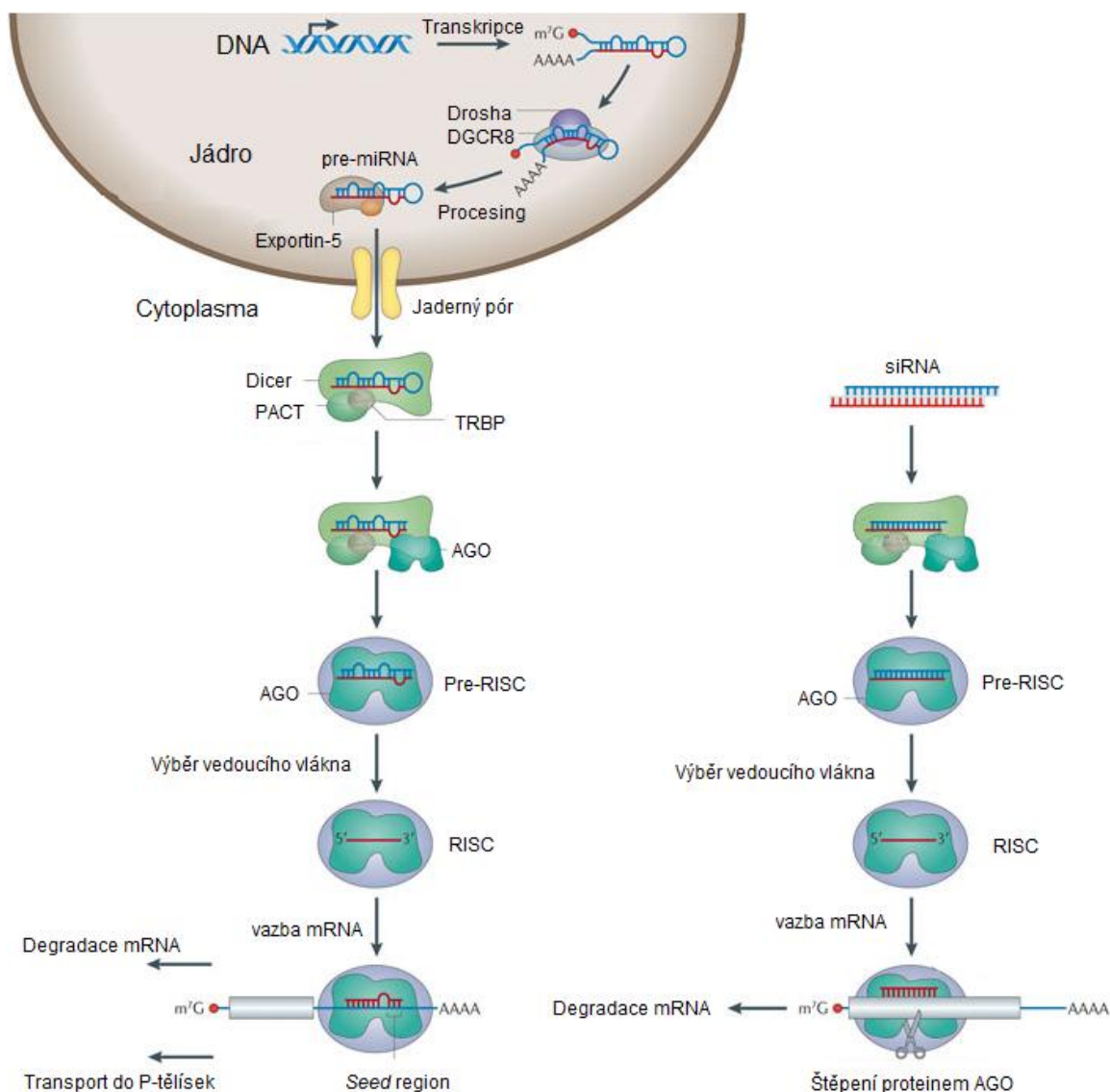
3.1 RNA interference

RNA interference je biologický proces, při kterém dochází k rozštěpení a následné degradaci molekuly mRNA, která je rozpoznána komplementární molekulou RNA v ribonukleoproteinovém komplexu nazývaném RISC (z ang. *RNA induced silencing complex*). Tento mechanismus se *in vivo* uplatňuje k regulaci genové exprese. Samotná RNA interference je v přirozených podmínkách vzácný jev. U savců se RNA interference vyskytuje jen zřídka, nejpozorovatelnější je tento proces v myších oocytech. RNA interferenci lze navodit poměrně efektivně díky experimentálním přístupům, za použití tzv. siRNA (*small interfering RNA* nebo *silencing RNA*) (Fire *et al.* 1998; Hammond *et al.* 2000; Elbashir *et al.* 2001; Watanabe *et al.* 2008).

Jak bylo zmíněno, *in vivo* se RNA interference ve velké míře nevyskytuje. Obdobný proces, který používá totožné proteiny a je hojně uplatňován v živých organizmech se nazývá miRNA dráha (z ang. *microRNA pathway*). miRNA dráha využívá endogenně produkované dvouvláknové miRNA. Z dvouvláknové miRNA s 3'přesahujícími konci je na základě termodynamických vlastností vybráno tzv. vedoucí vlákno (z ang. *guide strand*, někdy označováno jako *star strand*), které je drženo komplexem RISC, stejně jako při procesu RNA interference. miRNA dráha je způsob jak dokáže buňka regulovat genovou expresi na posttranskripční úrovni. Pro rozpoznání cílové molekuly mRNA je nezbytné, aby miRNA interagovala s mRNA v oblasti tzv. *seed regionu*. *Seed region* je oblast na molekule vedoucího vlákna miRNA, dostačující pro vyvolání efektu indukovaného miRNA dráhou. Posttranskripční regulace genové exprese tímto způsobem nutně nevede k degradaci rozpoznané mRNA, takový výsledek by nemusel být pro buňku výhodný. Molekuly mRNA rozpoznané komplexem RISC, díky vedoucímu vláknu miRNA, jsou uschovány v plasmatických ribonukleoproteinových strukturách, tzv. P-tělískách (z ang. *P-bodies*). V některých případech může opravdu dojít k degradaci mRNA rozpoznané komplexem RISC s navázanou miRNA. K takovému závěru dojde jen za určitých podmínek a to sice za vysoké komplementarity vedoucího vlákna miRNA s cílovou mRNA. Vedle této podmínky, ještě musí být v komplexu RISC přítomna taková isoforma proteinu Argonaut (Ago) která má funkční endonukleázovou aktivitu

(v lidském genomu se nachází 4 isoformy genů pro proteiny Ago, Ago1-4, přičemž pouze isoforma Ago2 má funkční endonukleolytickou aktivitu). V takovém případě opravdu mluvíme o RNA interferenci zprostředkované endogenní miRNA. Dva výše zmíněné procesy jsou často označovány jako větve miRNA dráhy (viz Obrázek 1) (Hutvagner *et al.* 2001; Khvorova *et al.* 2003; Höck & Meister 2008; Eiring *et al.* 2010; Guo *et al.* 2010).

siRNA je dvouvláknová molekula RNA, jejíž zdroj je na rozdíl od miRNA exogenní. Ať už je siRNA produkována na základě sekvence nukleové kyseliny viru, který napadl hostitelskou buňku, nebo je produktem chemické syntézy *in vitro*, její původ je mimobuněčný. Uměle nasyntetizovaná siRNA se prokázala jako velmi užitečný experimentální nástroj, který pomohl k objasnění funkce nesčetného množství genů, respektive jejich proteinových nebo RNA produktů. Tento experimentální přístup s sebou nese i určité nevýhody. Funkčnost, tedy schopnost molekuly siRNA procesem RNA interference do nějaké míry umlčet expresi určitého genu, nelze usuzovat pouze na základě její sekvence a musí být proto experimentálně ověřena. Není proto neobvyklé, že se i komerčně dostupná siRNA, která však nebyla experimentálně ověřena, projeví jako nefunkční. Další problém, který byl s metodikou siRNA spjatý, se podařilo vyřešit pomocí chemických modifikací siRNA molekul. Jak už bylo zmíněno u popisu miRNA (viz výše), jediná charakteristika určující vedoucí vlákno v duplexu miRNA je termodynamická vlastnost 5'konce, tj. velikost volné energie nutné k rozvolnění výše zmíněného konce od 3'konce přesahující komplementární RNA. 5'konec toho vlákna, u kterého je z výše uvedených důvodů snazší opustit komplementární molekulu, předurčuje toto vlákno k odstranění. Komplementární vlákno se naopak stane již zmíněným vedoucím vláknem. Proto se nejrůznější chemické modifikace, které mají za úkol zesílit nekovalentní vazby komplementárních vláken siRNA uplatňují na vlákně zájmu, jež bude těmito modifikacemi předurčeno ke zmíněné roli. Chemické modifikace podobného charakteru se také používají pro upevnění vazby *seed* regionu a komplementární sekvence na mRNA. Příkladem takových modifikací je tzv. LNA (z ang. *Locked nucleic acid*) (Braasch *et al.* 2003; Khvorova *et al.* 2003; Bramsen *et al.* 2009).



Obrázek 1: Schéma klasické miRNA dráhy a klasické RNA interference indukované pomocí siRNA. Geny kódující miRNA jsou přepisovány do podoby pri-miRNA pomocí RNA polymerázy II, některé miRNA mohou vzniknout z vystřižených intronů. pri-miRNA je rozpoznána proteinem DGCR8, který pomáhá ribonukleáze Drosha ve specifickém štěpení pri-miRNA. Tímto procesem vzniká pre-miRNA. Tato molekula je následně pomocí proteinu exportin-5 transportována do cytoplazmy, kde je enzymem Dicer štěpena za vzniku dvouvláknové molekuly RNA. Dvouvláknová molekula RNA je následně předána na proteinový komplex Pre-RISC (z ang. *pre-RNA induced silencing complex*), v tomto momentě zároveň dochází k selektivnímu výběru vedoucího vlákna. Po vazbě miRNA vzniká komplex RISC. Proteinový komplex RISC rozpoznává molekuly mRNA komplementární k vedoucímu vláknu miRNA, což zajišťuje minimální komplementarita se *seed* regionem na vedoucím vlákně miRNA. V případě vysoké komplementarity a přítomnosti Ago2 v RISC může dojít ke štěpení a následné degradaci rozpoznané mRNA, v opačném případě dochází k transportu komplexu i s molekulou mRNA do P-tělísek (Lund *et al.* 2004; Han *et al.* 2006; Lund & Dahlberg 2006; Kim & Kim 2007; Eulalio *et al.* 2008; MacRae *et al.* 2008; Eiring *et al.* 2010). Upraveno podle (Davidson & McCray 2011).

Přestože chemické modifikace nukleotidů inkorporovaných do sekvence siRNA přinesly mnohé výhody a negovaly nevýhody, které k práci s neupravenou siRNA patří, nejedná se způsob jak se zbavit všech problémů, které sebou siRNA metoda nesla. Nevyhnutelná problematika, která ovlivňuje do určité míry v závislosti na použité koncentraci siRNA pro transfekci buněčné linie, souvisí s rozpoznáním vedoucího vlákna siRNA necílové mRNA (tzv. *off-targeting*). Výše zmíněná problematika se projevuje dvěma způsoby. Základní, méně častý, projev souvisí s rozpoznáním necílové mRNA a její degradace mechanismem RNA interference. Tento vedlejší efekt se vyskytuje jen zřídka, protože je k uskutečnění výše popsaných událostí potřeba vysoká komplementarita sekvence vedoucího vlákna siRNA a necílové mRNA. Tento problém se dá obejít pečlivou přípravou siRNA, jejíž sekvence by měla mít co nejnižší komplementaritu k jakékoliv mRNA produkované příslušným organismem. Druhý vedlejší efekt, je tzv. *miRNA-like* efekt (z ang. *miRNA-like effect*, někdy také označována jako *miRNA-like off-target effect*). Tento vedlejší efekt se uplatňuje na necílových mRNA, se kterými má vedoucí vlákno komplementární *seed* region a část následující sekvence nebo pouze *seed* region případně dokonce jen jeho část. Vzhledem k charakteru *seed* regionu (délka 6 bází) se dá usuzovat, že *miRNA-like* efekt se projevuje mnohem častěji než výše zmíněný *off-target* efekt, který má za následek RNA interferenci. *miRNA-like* efekt obvykle nekončí RNA interferencí, nýbrž se projevuje jako klasická miRNA dráha, která vede rozpoznané molekuly mRNA do P-tělísek, ve kterých může dojít k následné degradaci přivedené mRNA. Nutno podotknout, že *miRNA-like* efekt se projevuje při každém experimentu; každá použitá siRNA do jisté vykazuje *miRNA-like* efekt. Projev *miRNA-like* efektu nutně neznamena, že dojde k naprostému vymizení určité skupiny necílových mRNA, které jsou danou siRNA rozpoznány, nicméně takový závěr se nedá vyloučit. Ve většině případů navíc nehrozí, že by se tento efekt relevantně podílel na pozorovaném fenotypu. Dle teorie není *miRNA-like* efekt, který má opravdu vliv na pozorovaný fenotyp, objeven, pokud není cíleně hledán (Jackson *et al.* 2003; Liu *et al.* 2005; Yilmazel *et al.* 2014).

miRNA-like efekt představuje největší problém v případě, kdy má gen, který se snažíme umlčet, v genomu paralog. Čím vyšší je sekvenční identita paralogů, tím vyšší je šance, že se *miRNA-like* efekt projeví. Protože čím vyšší je sekvenční identita, tím větší je šance, že se sekvence komplementární k vedoucímu vláknu

siRNA, vyskytne i v sekvenci mRNA paralogu. Projev miRNA-like efektu pak může v takovém případě zavinit fenotypový projev, který může být chybně interpretován jako výsledek selektivního umlčení konkrétního genu.

3.2 Signalizace a MAPK/ERK signální kaskáda

Pro existenci buňky v rámci celého organismu, ale i pro jednobuněčné organismy, je nezbytné aby, tento živý systém dokázal přijímat informace z vnějšího prostředí a patřičně na ně reagoval. Zároveň je potřeba, aby byl získaný signál interpretován do vnitřního prostředí buňky, kde už dochází k jeho přenosu a příslušné reakci. Výše zmíněné vlastnosti živého systému a komponenty, které se těchto dějů účastní, se obecně skrývají pod označením signalizace. V případě buněčného systému mluvíme o buněčné signalizaci.

Buněčná signalizace jako taková se dá považovat za modulární systém. Vícesložkové chápání signalizace dovoluje pozorovatelům jistou míru orientace při přenosu signálu mezi jednotlivými složkami signalizace. Jednou ze základních složek signalizace jsou signální dráhy a signální kaskády (oba pojmy se často používají pro označení stejného pojmu, v kontextu literatury už nelze vypátrat faktický rozdíl). Signální dráha je soubor proteinů, které chemickými modifikacemi nebo nekovalentními interakcemi přenáší signál z jedné úrovně dráhy na následující. Přenášený signál se nejčastěji vyskytuje ve dvou formách: kovalentní chemické modifikace nebo interakce vedoucí k strukturní a funkční změně. Jedním z nejzákladnějších příkladů chemické modifikace je vedle mnohých dalších fosforylace, ubiquitinylace nebo acetylace.

Další charakteristikou signalizace jsou přesahy mezi jednotlivými signálními kaskádami (z ang. *crosstalks*) a zpětnovazebné smyčky (z ang. *feedback loops*). Obě výše popsané charakteristiky slouží k regulaci signální kaskády. V případě přesahů signálních drah se dá mluvit o další funkci a to sice o určení specifity signalizace. Žádná signální dráha by neměla být sama o sobě schopna iniciovat reakci buňky na konkrétní signál. Proto jsou reakce na konkrétní signály často zprostředkovány více signálními drahami, které mohou přesahovat jedna v druhou. Zároveň existují případy, kdy je aktivace jedné dráhy potřeba k aktivaci jiné dráhy a je tedy funkční prerekvizitou děje.

Buněčná signalizace je jednou z nejdůležitějších a nejstudovanějších vlastností živého systému. V internetové databázi *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) je za posledních 40 let k nalezení 17086 vědeckých publikací, které ve svém názvu obsahují anglický ekvivalent slova signalizace, tedy *signalling*. Nepočítaje velké množství publikací, které se signalizací, ať už přímo nebo nepřímo zabývají, ale v názvu ji nemají. Jen z roku 2016 údaje z výše zmíněné databáze poskytují číslo 937, jakožto počet publikací, které se v této databázi nacházejí a v názvu obsahují slovo *signalling* (údaje ke dni 2. 8. 2016), což jsou téměř tři čtvrtiny všech publikací se stejnou charakteristikou z roku 2015. Lze předpokládat, že toto číslo se bude stále navyšovat i v letech budoucích, hlavně díky dostupnějšímu sekvenování a potenciální personalizované medicíně nebo CRISPR/Cas9 generovaným *knock-out* modelovým organismům, respektive CRISPR interferenci (Qi *et al.* 2013; Sternberg *et al.* 2014).

Jednou z nejstudovanějších signálních kaskád je MAPK/ERK signální dráha (z ang. *mitogen-activated protein kinase/ Extracellular signal-regulated kinase*). Tato dráha je spjata s mnohými buněčnými ději, například proliferací, diferenciací nebo migrací buněk. Podobným způsobem je MAPK/ERK signální kaskáda skloňována ve vztahu k onkogenezi (viz níže).

Signální kaskáda MAPK/ERK se skládá z několika hlavních proteinových komponentů, které jsou považovány za klasické součásti výše zmíněné dráhy (viz Obrázek 2). Jedná se o malý G-protein Ras, serin/treonin specifickou proteinkinázu Raf, duálně specifickou proteinkinázu MEK a serin/treonin specifickou proteinkinázu ERK. Všechny zmíněné proteiny se vyskytují ve více isoformách, exprimovaných z různých alel genů, nebo vznikajících alternativním sestřihem (Aebersold *et al.* 2004).

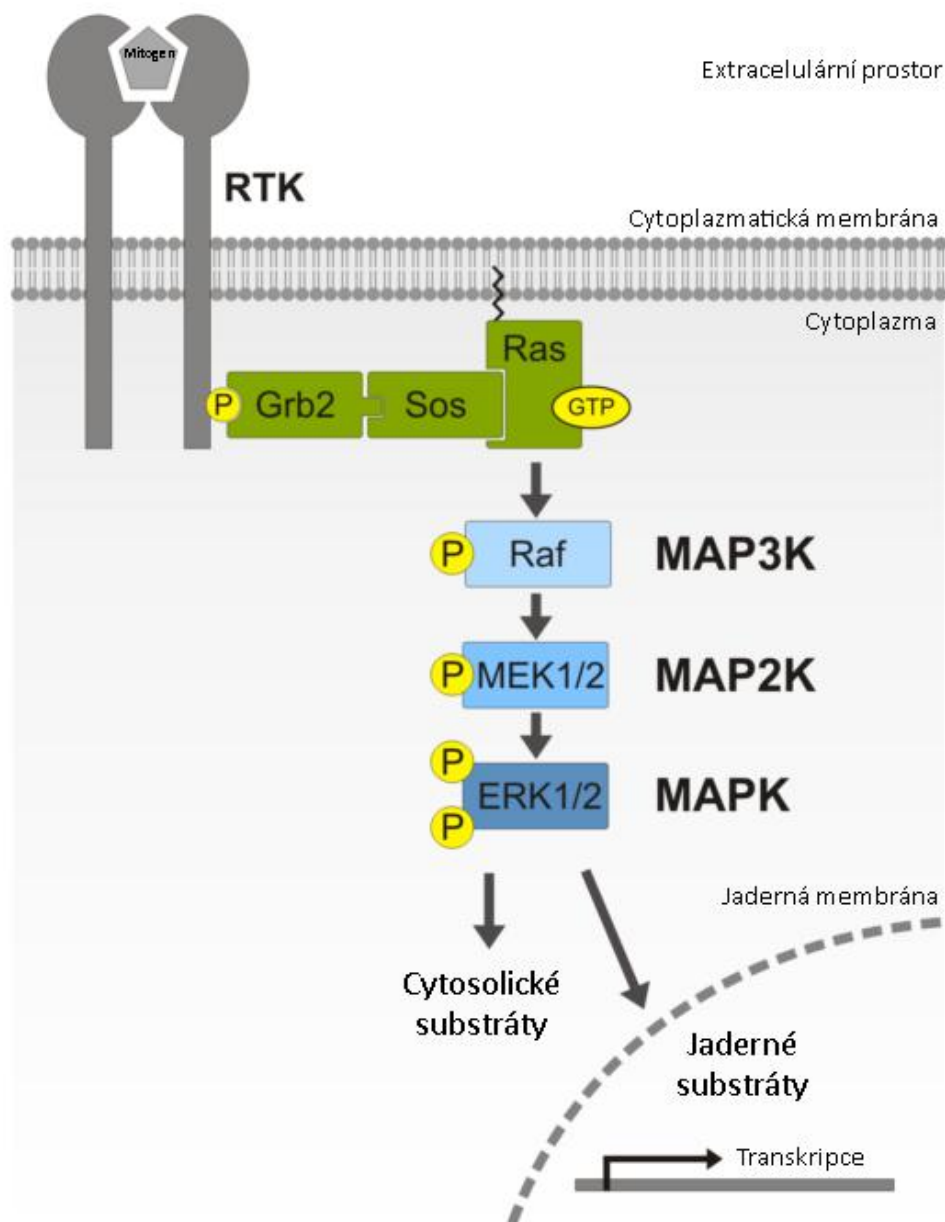
Malé G proteiny rodiny Ras (H-, K-, N-Ras) se vyskytují na cytosolické straně buněčné membrány, kde jsou ukotveny farnesylovou skupinou kovalentně připojenou na C-koncový cystein proteinu. Jako ostatní malé G proteiny se Ras vyskytuje ve dvou formách, neaktivní s navázaným GDP a aktivní s navázaným GTP. Pro aktivaci je potřeba interakce s proteinovým faktorem nahrazující guanosin (z ang. *guanine nucleotide exchange factor*, GEF), například s proteinem SOS1, který může fungovat jako GEF pro Ras a aktivovat jej. Protein SOS1 se vyskytuje ve vazbě s dalšími

proteiny a tvoří tzv. adaptorový komplex, což je seskupení více proteinů přenášející signál z aktivovaných receptorových proteinů, např.: EGFR, na signální kaskády typu MAPK/ERK. Další komponentou adaptorového komplexu může být protein Grb2, který díky SH2 doménám přímo interaguje s fosforylovanými tyrosinovými aminokyselinovými zbytky na aktivovaném receptoru (Trahey & McCormick 1987; Vogel *et al.* 1988; Casey *et al.* 1989; Buday & Downward 1993).

Další proteinovou komponentou, která přímo interaguje s proteinem Ras skrze dvě interakční domény, je proteinkináza Raf (A-, B-Raf, Raf-1) (Vojtek *et al.* 1993; Zhang *et al.* 1993; Brtva *et al.* 1995; Drugan *et al.* 1996). Jedná se o serin/treonin specifickou proteinkinázu podléhající mnoha posttranslačním modifikacím, které jsou v některých případech nezbytné pro funkci proteinkinázy, v jiných případech dokážou aktivovat proteinkinázu Raf bez potřeby interakce s aktivní formou malého G proteinu Ras (Kolch *et al.* 1993; Morrison *et al.* 1993; Leever *et al.* 1994). Například dlouho známý nízkomolekulární chemický aktivátor MAPK/ERK signální kaskády je PMA (z ang. *phorbol 12-myristate 13-acetate*), který patří do skupiny forbol esterů. PMA je přímým aktivátorem isoformu proteinkinázy C fosforylující protein Raf a tím aktivují MAPK/ERK kaskádu (Ueda *et al.* 1996).

Proteinkináza Raf fosforyluje a tak aktivuje duálně specifickou proteinkinázu MEK1 a MEK2 (MEK1/2, z ang. *Mitogen-activated/ERK kinase 1/2*) (Kyriakis *et al.* 1992). Duálně specifická proteinkináza MEK1/2 je poměrně zajímavým úkazem v rodině proteinkináz, protože má velmi úzkou specializaci. Jediným známým substrátem proteinkinázy MEK1/2 jsou proteinkinázy ERK1 a ERK2 (Segar *et al.* 1992; Matsuda *et al.* 1992).

Hlavními komponenty MAPK/ERK signální kaskády jsou serin/treonin specifické proteinkinázy ERK1 a ERK2. K jejich aktivaci je potřeba fosforylace proteinkinázou MEK1/2 na aminokyselinových zbytcích T202 a Y204 (ERK1), respektive T185 a Y187 (ERK2) (Ray & Sturgill 1988; Payne *et al.* 1991). Enzymy MEK1/2 a ERK1/2 tvoří základní modul MAPK/ERK signální kaskády, jinak řečeno, ostatní komponenty této kaskády jsou variabilní. Například v makrofázích může být MEK1/2 aktivována proteinkinázou Tpl2 (MAP3K8) v reakci na lipopolysacharidovou stimulaci TLR4 receptorů. Podobně funguje i proteinkináza MOS (Nebreda *et al.* 1993; Banerjee *et al.* 2006; Johannessen *et al.* 2010).



Obrázek 2: Schéma typické MAPK/ERK signální kaskády. Membránová receptorová tyrosin kináza (RTK) po vazbě mitogenu (například EGF, PDGF) tvoří homodimer, dochází k autokatalytické fosforylaci aminokyselinových zbytků v cytosolu. Fosfotyrosinové aminokyselinové zbytky jsou rozpoznány adaptorovým proteinem Grb2. Protein Grb2 váže faktor nahrazující guanosin, Sos. Protein Sos aktivuje malý G protein Ras, který interakcí aktivuje proteinkinázu Raf. Proteinkináza Raf fosforyluje MEK1/2, který následně fosforyluje ERK1/2. Aktivovaná proteinkináza ERK1/2 následně fosforyluje velké množství proteinových substrátů v cytosolu i v jádře. Upraveno podle (Meister *et al.* 2013).

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 se dají považovat za finální proteiny MAPK/ERK signální dráhy, avšak toto tvrzení je přesné jen z části. Informace z membrány, ke které přichází v podobě mitogenů, je sice přenesena až na enzymy ERK1 a ERK2, tyto proteiny jsou však schopny přenést informaci na další úroveň, která zahrnuje obrovské množství substrátů. Mezi 284 známými interakčními partnery, zahrnující i substráty proteinkináz ERK1 a ERK2, jsou další enzymy, které jsou schopny svou aktivitou šířit informaci na další množství svých substrátů. Proteiny ERK1 a ERK2 jsou tak centrálním bodem, kde se shromažďuje informace z více zdrojů (Yoon & Seger 2006; von Kriegsheim *et al.* 2009).

Pro identifikaci substrátu nebo interakčního partnera proteinkináz ERK1 a ERK2 je nutné, aby případný interakční partner obsahoval interakční domény, respektive fosforylační motiv. Fosforylační motiv pro proteinkinázy ERK1/2 je totožný, zajišťuje jej tato sekvence: Pro-Xxx-(Ser/Thr)-Pro. Podmínkou je, aby se na pozici Xxx nevyskytoval prolin. I díky sekvenci fosforylačního motivu jsou proteinkinázy ERK1 a ERK2 někdy označovány jako kinázy specifické na prolin (z ang. *Prolin specific kinases*). Fosforylační motiv není sám o sobě schopen zajistit účinnou interakci s ERK1/2, proto je nezbytné, aby protein obsahoval alespoň jednu z interakčních domén. Interakční domény jsou označovány různými názvy podle toho, jak se rozvíjelo poznání o těchto strukturách. Často používaná označení jsou D-vazebná doména a F-vazebná doména, nebo jejich označující ekvivalenty Obecná vazebná doména, respektive Subdoména vázající FXFP motiv (Clark-Lewis *et al.* 1991; Songyang *et al.* 1996; Jacobs *et al.* 1999; Tanoue *et al.* 2000; Lee *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2006).

Popisu struktury proteinkináz ERK1 a ERK2, včetně interakčních domény, se autor této práce podrobně věnoval ve své bakalářské práci z roku 2014 (Příbyl 2014) Pro bližší informace doporučuji právě tuto rešerši.

3.3 Rozdílnost a redundance proteinkináz ERK1 a ERK2

Proteinkinázy ERK1 a ERK2 vypadají v mnoha ohledech téměř totožně. Vysoká sekvenční identita na úrovni kódující sekvence, která činí 65,5% (sekvenční porovnávání jsme uskutečnili pomocí *Clustal Omega* verze 1.2.2, primární sekvence kódujících oblastí mRNA pochází z databáze Ensembl, GRCh38). Vysoká sekvenční

identita na úrovni primární sekvence proteinů, 87% (sekvenční porovnávání jsme uskutečnili pomocí *Clustal Omega* verze 1.2.2, primární sekvence proteinů pochází z databáze UniProt, ERK1 ID: MK03_HUMAN, AC: P27361-1, ERK2 ID: MK01_HUMAN, AC: P28482-1). Obě tyto hodnoty jednoznačně poukazují na paralogy. O totožné funkci přesvědčuje podobnost interakčních domén i podobnost na úrovni terciární struktury obou proteinů celkově. Mechanismus katalýzy je totožný, dokonce zahrnuje ekvivalentní aminokyselinové zbytky. Navíc dosud nebyl identifikován substrát nebo interakční partner, který by byl unikátní pro jednu nebo druhou isoformu enzymu ERK1, respektive ERK2. Obě proteinkinázy jsou také aktivovány na popud stejných signálů (Goujon *et al.* 2010; Sievers *et al.* 2011; McWilliam *et al.* 2013; Consortium 2014; Aken *et al.* 2016).

Všechny výše zmíněné poznatky naznačují, že proteinkinázy ERK1 a ERK2 by mohly mít totožnou funkci. Přesto stále vyvstává otázka, zda je mezi oběma proteiny funkční rozdíl.

Důvodem nejasností jsou práce různých vědeckých skupin, které na základě experimentálních výsledků usuzují, že existuje funkční rozdílnost proteinkináz ERK1 a ERK2. O kritické zhodnocení všech prací týkající se výše zmíněného tématu se v nedávné době postarala skupina autorů ve skvěle prezentované formě v přehledovém článku Buscà *et al.* 2016. Množství publikací vypovídá o tom, že se jedná o jednu z podstatných a relevantních otázek základního výzkumu na poli buněčné biologie (Buscà *et al.* 2016). Autor této diplomové práce se také věnuje této problematice, přidává i vlastní názor, čímž se místy principiálně odlišuje od výše zmíněného přehledového článku.

Jednou z teorií vysvětlující rozdíl mezi ERK1 a ERK2 je teorie týkající se transportu proteinkináz ERK1 a ERK2 do jádra. Velké množství substrátů výše zmíněných proteinkináz se nachází právě v jádře, nejčastěji skloňovanými jsou transkripční faktory, které iniciují transkripci genů potřebných pro postup v buněčném cyklu buňky a buněčném růstu (elk1 a následně i c-fos). I proto je transport proteinů ERK1 a ERK2 do jádra nezbytný. Transport aktivovaných proteinkináz ERK1 a ERK2 do jádra je zprostředkován více způsoby. Fosforylace aminokyselinových zbytků S263/246 a S265/248 (první pozice pro ERK1, druhá pro ERK2), které slouží jako jaderný lokalizační signál, zajišťuje rozpoznání proteinem Importin 7. Následně je

proteinkináza ERK1, respektive ERK2 transportována do jádra pomocí Ran-závislého mechanismu. Další možností, jak se může dostat enzym ERK2 do jádra, je pomocí pasivní difuze. Právě na transportu do jádra pasivní difuzí je postavena jedna z teorií, která navrhuje rozdílnost mezi proteinkinázami ERK1 a ERK2. Protein ERK1 je z hlediska molekulové hmotnosti větší, než ERK2 (43 kDa ERK1 a 41 kDa ERK2, údaje pochází z databáze UniProt). Vzhledem k vlastnostem komplexu jaderného póru, který dokáže mechanismem pasivní difuzí vpustit do jádra pouze molekuly o molekulové hmotnosti $< \sim 40$ kDa a vzhledem k výsledkům skupiny Marchi *et al.*, publikovaným v práci z roku 2008, se usuzovalo, že ERK1 je o tuto možnost částečně nebo zcela ochuzena. Kinetika transportu proteinkinázy ERK1 do jádra by byla z výše zmíněných důvodů pomalejší a celková rychlost odpovědi na stimulační signály by se zpomalovala s rostoucí mírou aktivity ERK1 (Marchi *et al.* 2008; Chuderland *et al.* 2008; Plotnikov *et al.* 2011).

Vedle výše zmíněných mechanismů transportu ERK1/2 do jádra byly popsány i další, například pomocí interakce ERK1/2 s FG repetitivy proteinů jaderného póru. Práce popisující tento mechanismus byly uskutečněny pouze na isoformě ERK2. Vztažení výsledků i na isoformu ERK1 vychází pouze z předpokladů, že mezi oběma proteiny není funkční rozdíl. Otázkou zůstává, do jaké míry by se dalo pozorování transportu proteinkináz ERK1/2 do jádra pomocí pasivní difuze (Marchi *et al.* 2008) odlišit od transportu do jádra zprostředkované interakcí s proteiny jaderného póru (Whitehurst *et al.* 2002; Lee *et al.* 2004; Yazicioglu *et al.* 2007). A zda je pasivní difuzi možno brát jako relevantní transport proteinů ERK1/2 do jádra v případě, že se tento typ transportu může kdykoliv přeměnit v typ transportu zprostředkovaný interakcí s proteiny jaderného póru. Navazující studie prokázaly, že určité proteiny jaderného póru jsou substrátem pro proteinkinázu ERK2. Fosforylace zmíněných proteinů jaderného póru navíc urychluje transport ERK2 do jádra (Vomastek *et al.* 2008; Kosako *et al.* 2009; Shindo *et al.* 2016).

Důležité experimentální práce, které mnohé utvrdily v hledání rozdílné funkce proteinkináz ERK1 a ERK2, byly uskutečněny na *knock-out* myších. Při inaktivaci obou alel genu pro protein ERK2 (*MAPK1*) v modelových myších došlo k úmrtí zárodků před jejich narozením. Letalita byla způsobena neschopností tvorby mezodermu (Hatano *et al.* 2003; Yao *et al.* 2003). V opačném případě, tedy při vyřazení z funkce obou alel genu pro protein ERK1 (*MAPK3*), nebyly pozorovány

žádné vážné fenotypové změny (Pagès *et al.* 1999; Nekrasova *et al.* 2005). Naopak v případě *knock-out* myší pro gen *MAPK3*, bylo pozorováno zlepšení určitých vlastností v porovnání s negativními kontrolami. Myši s genotypem *ERK1^{-/-}* vykazují lepší dlouhodobou paměť, vyšší schopnost učení, vyšší pohyblivost, ale také vyšší tendence k závislostem. Na molekulární úrovni se podařilo prokázat, že modelové organizmy, které neexprimují proteinkinázu ERK1, vykazují vyšší hladinu aktivované formy proteinu ERK2 ve srovnání s negativní kontrolou (Mazzucchelli *et al.* 2002).

Alison C. Lloyd ve své krátké práci publikované v roce 2006 prezentuje myšlenku vycházející z poznatků publikací, které ať už přímo či nepřímo pozorují rozdíly při umlčování jednotlivých genů pro enzymy ERK1 nebo ERK2. Ve své práci autor navrhuje myšlenku, ve které je označován ERK1 za „horší“ z obou isoform. Podle této teorie by ERK1 byl schopen naplňovat všechny funkce, stejně jako ERK2, avšak s horší účinností nebo pomaleji. Přestože výše zmíněná teorie není podložena měřeními aktivit jednotlivých isoform ERK1 a ERK2, dal by se pomalý charakter proteinkinázy ERK1 částečně přičíst k translokaci do jádra, o kterou je podle poznatků skupiny Marchi *et al.* protein ERK1 částečně ochuzen (Lloyd 2006; Marchi *et al.* 2008).

Další teorie, v současné době asi nejvíce přijímaná, je spjata s globální aktivitou proteinů ERK1 a ERK2. Změny v globální (tj. celobuněčné) aktivitě obou proteinů ERK1/2 zodpovídají za pozorované změny ve fenotypu. Jinak řečeno, nezáleží na tom, která s isoform je nefunkční nebo umlčena, ale do jaké míry se tento fakt projevuje na celkové aktivitě ERK1/2. Zastoupení jednotlivých proteinů ERK1 a ERK2 v této globální aktivitě je do jisté míry tkáňově specifické. Je důležité si uvědomit, že tato globální aktivita se skládá z aktivit dvou proteinkináz, a že poměr těchto proteinů a jejich zásah do globální aktivity ERK1/2 se liší v závislosti zastoupení obou proteinů v buňce, která přímo souvisí s hladinou exprese příslušných genů (Lefloch *et al.* 2008, 2009).

S touto teorií se ztotožňují i autoři přehledového článku Buscà *et al.* 2016. Navíc je výše zmíněná teorie podpořena nedávnou publikací provedenou na *knock-out* a *knock-in* myších. V této práci skupina Frémin *et al.* prezentují data získaná na modelových myších s deletovanými geny pro proteiny ERK1 i ERK2, avšak s vloženým genem pro ERK1 pod konstitutivním promotorem, který zajišťuje stejnou

expresi genu pro proteinkinázu ERK1 ve všech tkáních organismu. Takto modifikované myši mají fenotyp prakticky nerozeznatelný od kontrolní skupiny. Zastoupení aktivované formy ERK1 u jedinců s integrovaným konstitutivně exprimovaným genem pro ERK1 a s nulovou endogenní produkcí ERK1, respektive ERK2, byla totožná s hladinou aktivovaných forem ERK1 a ERK2 v kontrolních jedincích (Frémin *et al.* 2015; Buscà *et al.* 2016).

3.4 Iniciace translace u eukaryot

Translace je jeden z nejdůležitějších procesů v živých organizmech. Jedná se o poslední krok klasického toku genetické informace neboli centrálního dogmatu molekulární biologie, při kterém na základě informace v sekvenci molekuly mRNA vznikají proteiny. Translace se dá rozdělit do dvou hlavních částí. V té první vznikají konjugáty molekul tRNA s aminokyselinovými zbytky (tzv. nabité tRNA). V tomto procesu dochází ke specifickému rozeznání molekul tRNA enzymem aminoacyl-tRNA syntetázou, který připojuje aktivovaný aminokyselinový zbytek (aminoacyl adenosinmonofosfát) na molekulu tRNA. Během tohoto velmi regulovaného mechanismu, který u některých aminoacyl-tRNA syntetáz zahrnuje i zpětnou opravnou aktivitu, dochází k tvorbě nabitých tRNA, které jsou následně rozpoznány iniciačními, respektive elongačními faktory. Druhá část translace, také označována jako ribozomální část, se odehrává na ribozomálních podjednotkách a dochází při ní k vlastní syntéze proteinů. Ribozomální část translace se dělí na tři hlavní části: iniciaci, elongaci a terminaci.

Translatovaná mRNA

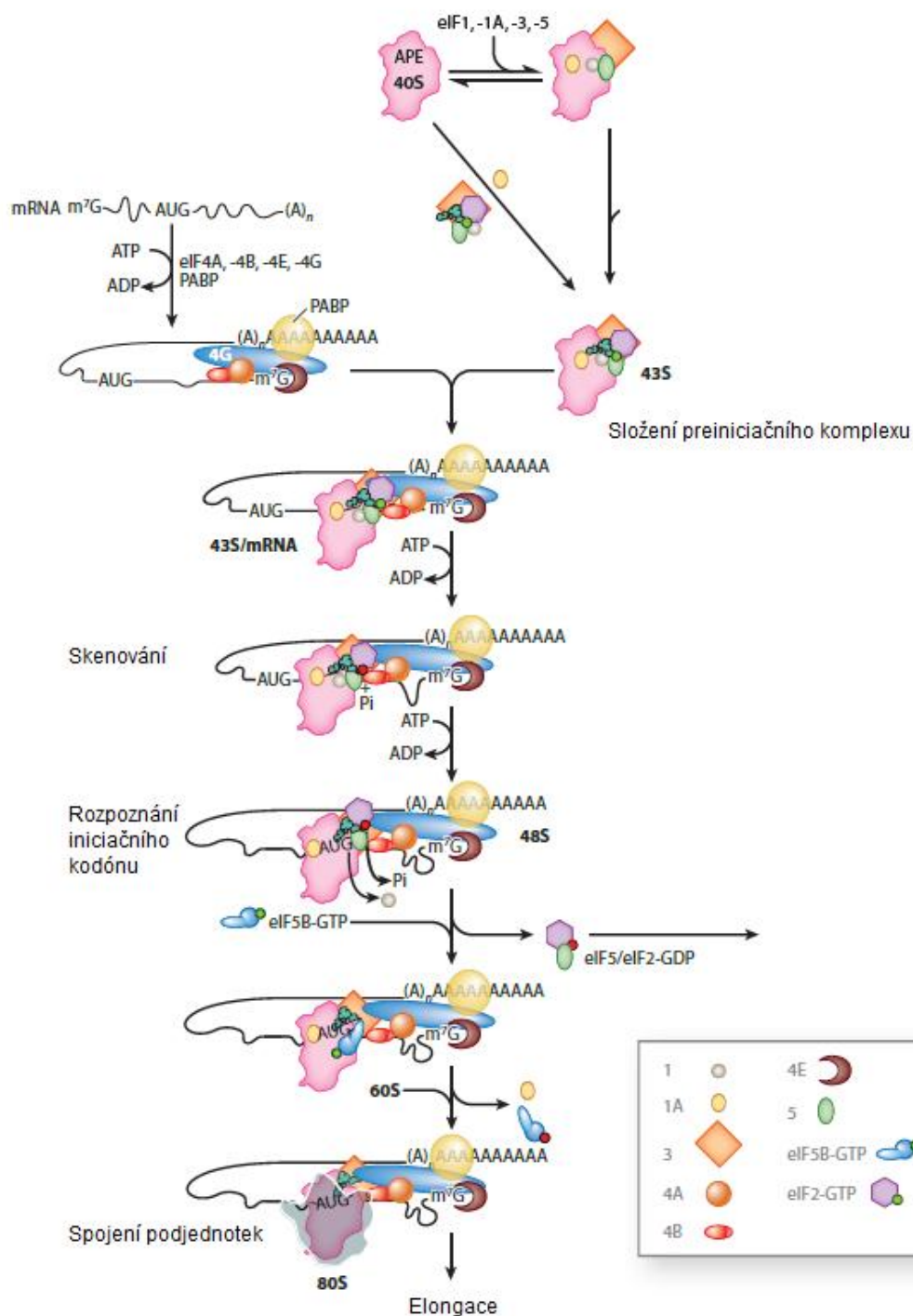
Po transkripci jaderných genů RNA polymerázou II, vznikají prekurzory mRNA, tzv. pre-mRNA. Tyto molekuly jsou upraveny do podoby již zmíněné mRNA. Úpravami prochází 5'konec, 3'konec, ale i vnitřní sekvence pre-mRNA. Dochází k syntéze metyl-7-guanosinové čepičky na 5'konci pre-mRNA (tzv. čepička, z ang. *cap*), vystřížení intronových sekvencí a syntéze polyadenosinového konce (tzv. poly-A konec). 5'koncová čepička dovoluje stejně jako poly-A konec vyšší stabilitu molekuly mRNA. Vedle toho obě tyto struktury slouží k translaci, přičemž velký důraz je právě na 5'koncovou strukturu, která je rozpoznávána a je naprostou nutností pro iniciaci translace eukaryotických mRNA. Připravená molekula mRNA je následně

exportována do cytoplazmy, kde je rozpoznána translačními faktory. Komplex proteinů, souhrně označován jako eIF4F, rozpoznává na molekule mRNA několik struktur. eIF4F se skládá z více proteinů: eIF4E, eIF4G, eIF4A a PABP. Největší z nich, eIF4G, funguje jako lešení, které dovoluje vazbu dalších proteinů komplexu eIF4F a zároveň dokáže vázat samotnou mRNA. Protein eIF4E rozpoznává strukturu čepičky. PABP (z ang. *poly-A binding protein*) rozpoznává poly-A konec molekuly mRNA. RNA helikáza eIF4A slouží k lokálnímu rozvinutí sekundárních a terciárních struktur mRNA, aby mohly proběhnout další děje (viz níže).

Iniciace translace

Iniciace translace je prvním krokem v ribozomální části translace (viz Obrázek 3). Před samotnou iniciací je potřeba, aby vznikl komplex malé podjednotky ribozomu s eIF2-GTP-tRNA_i, tzv. preiniciační komplex (z ang. PIC, *preinitiation complex*). Preiniciační komplex se váže na 5'konec mRNA díky eIF3, který je rozpoznán proteinem eIF4G. Dále je PIC rozpoznáván faktory eIF1, eIF1A a eIF5. Procesem skenování je mRNA díky eIF4A posouvána komplexem PIC. Během tohoto děje faktory eIF1, eIF1A, eIF5, eIF2 a eIF3 zajišťují konformaci PIC, která dovoluje interakci tRNA_i s triplety na molekule mRNA. Při rozpoznání komplementárního, iniciačního, kodónu dojde k zastavení skenování. Při rozpoznání iniciačního kodónu dojde k hydrolýze GTP v komplexu s eIF2, tato reakce je zprostředkována enzymem eIF5, který se chová jako GTPázu aktivující protein při změně konformace eIF2, ke které dojde po rozpoznání iniciačního kodónu molekulou tRNA_i.

Po výše zmíněných událostech dojde k uvolnění eIF2-GTP spolu s faktorem eIF5, což dovoluje vazbu velké podjednotky ribozomu. Po vazbě velké podjednotky ribozomu, zprostředkované faktorem eIF5B, vzniká kompletní ribozom, který je připraven na další krok translace, elongaci.



Obrázek 3: Schéma iniciace translace vyšších eukaryot. Schéma popisuje jednotlivé kroky iniciace translace, viz text. Upraveno podle (Hinnebusch 2014).

Translace je komplexní děj s mnoha body, které podléhají přísné regulaci. Není kapacitou této práce zahrnout veškerou komplexitu tohoto procesu. Vzhledem k charakteru této práce je výše zmíněná část nezbytná a zároveň postačující pro

pochopení dalších souvislostí. Proto se zde odvoláváme na přehledové články, které do detailu popisují jednotlivé kroky translace (Jackson *et al.* 2010; Hinnebusch 2014).

3.5 Inicie translace zprostředkovaná HCV IRES

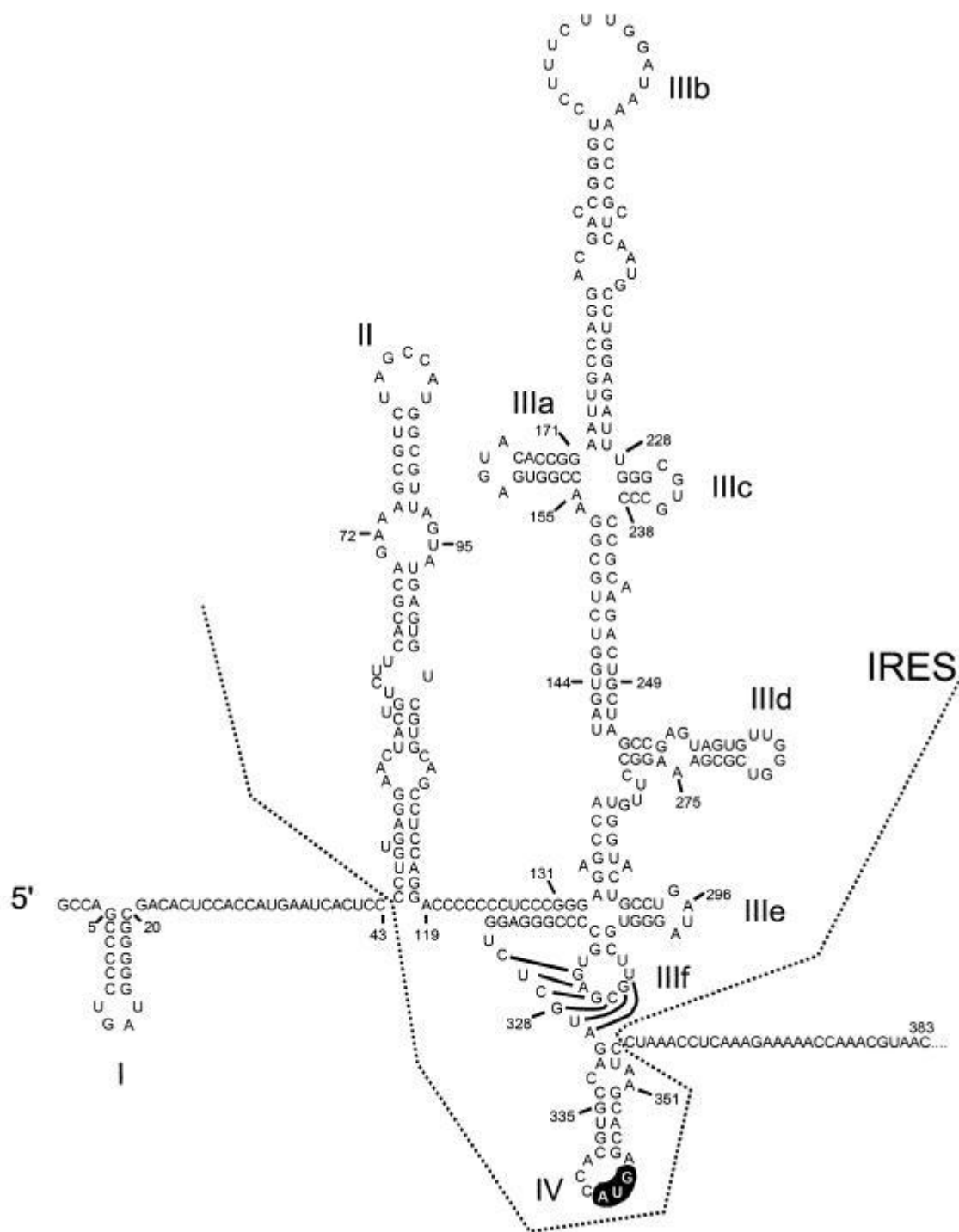
Virus žloutenky typu C (z ang. *hepatitis C virus*, HCV) je intracelulární patogen, který způsobuje projevy tzv. infekční hepatitidy, tedy žloutenky typu C. Toto onemocnění se projevuje onemocněním jater a právě jaterní tropismus je jednou z hlavních charakteristik HCV. Žloutenka typu C může způsobit i chronický zánět jater, který může vyústit až v cirhózu jater či jaterní karcinom. Tyto zmíněné následky jsou vyvolávány několika způsoby. Nejdříve se předpokládalo, že v reakci na napadení virem produkují hepatocyty prozánětlivé cytokiny, imunitní systém hostitele indukuje buněčnou smrt jaterních buněk. Společně s prozánětlivou signalizací dochází k poškození DNA, které může vést k tumorigeneze. Avšak v pokročilých studiích se ukázalo, že i samotné proteiny produkované z jednovláknového RNA genomu HCV mohou způsobovat buněčný stres a poškození DNA. Konkrétně se jedná o *core* protein (v tomto případě se autor rozhodl ponechat originální anglický název proteinu, protože jakýkoliv český překlad by se neshodoval s funkčním označením proteinu). Tento protein je součástí dlouhého polyproteinového peptidu, který vzniká po translaci genomu viru HCV. Polyproteinový produkt je následně rozštěpen buněčnými a virovou proteázou za vzniku deseti rozdílných proteinů: *core*, E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B (Farci *et al.* 1991; Choo *et al.* 1991; Wang *et al.* 1994; Rijnbrand *et al.* 1995; Honda *et al.* 1996).

Core protein dokáže, vedle výše zmíněných příčin tumorigeneze, indukovat jaterní karcinom. Vazbou do membrány mitochondrií narušuje funkci elektron transportního řetězce, což vede k zvýšené tvorbě reaktivních kyslíkových sloučenin (ROS). *Core* protein je schopen indukovat expresi TNF α a sekreci interleukinu-1 β . Oba tyto cytokiny patří mezi induktory buněčné senescence, která se projevuje aktivní signalizací poškození DNA. Všechny výše zmíněné následky infekce virem HCV vedou k možnému poškození DNA, které je často spřáжено s nádorovým bujením. Navíc je v buňkách infikovaných virem žloutenky typu C aktivní signalizace MAPK/JNK. Tato signalizace je schopna indukovat expresi cyklinu

D1 a Cdk4 skrze aktivované transkripční faktory dimeru AP-1. Tato aktivace je schopna pomoci rychlejšímu a snadnějšímu průchodu do S fáze buněčného cyklu, nejspíše i v buňkách postihnutých poškozením DNA či mutacemi (Moriya *et al.* 1998; Okuda *et al.* 2002; Tsutsumi *et al.* 2002, 2003).

Iniciace translace HCV není závislá na čepičce jako klasická eukaryotická translace (viz 3.4 Iniciace translace u eukaryot). Místo toho využívá terciární struktury RNA v 5' nepřekládané oblasti genomu viru. Tato struktura se nazývá HCV IRES (z ang. *hepatitis C virus Internal Ribosome Entry Site*). Díky této struktuře je virus schopen pomocí omezeného množství iniciačních faktorů a ribozomálních podjednotek iniciovat svojí translaci. Nejedná se o strukturu unikátní pouze pro viry, přestože je virová IRES nejvíce studovanou. mRNA některých endogenních cytokinů nebo cyklinů obsahuje IRES, která jim pomáhá v translaci. Otázka, zda je tato struktura opravdu tak významná i v endogenních případech je však stále v centru pozornosti některých výzkumných skupin (Wang *et al.* 1994; Rijnbrand *et al.* 1995; Honda *et al.* 1996; Akiri *et al.* 1998; Gilbert 2010).

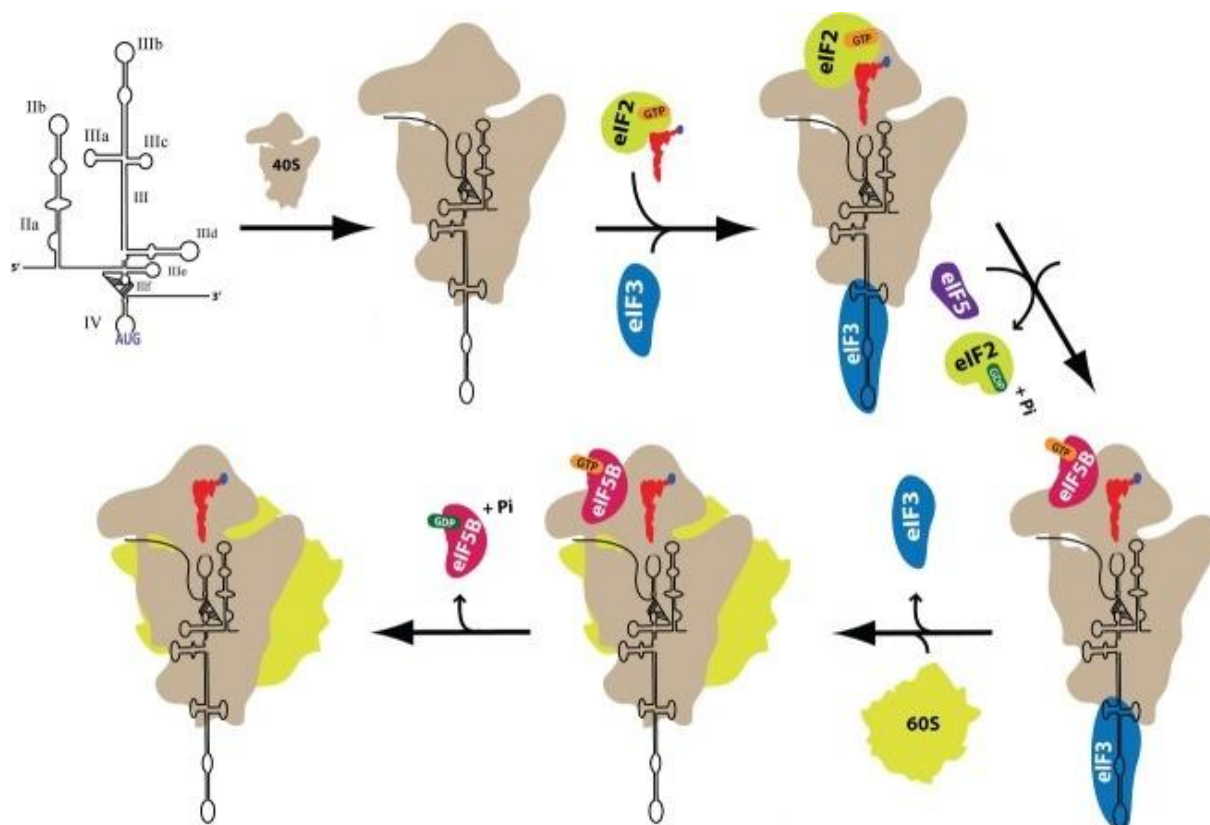
HCV IRES je více doménová struktura, skládající se z domén I, II, III a IV lokalizovaných na přibližně 340 nukleotidech (viz Obrázek 4). Výše zmíněné domény jsou následně rozděleny do několika subdoména. Nejdůležitější domény jsou II, III a IV, u těchto částí HCV IRES byla prokázána nezbytnost v procesu iniciace translace. Doména IV obsahuje iniciační kodón AUG. Naproti tomu doména I není pro proces iniciace translace důležitá (Kolupaeva *et al.* 2000; Odreman-Macchioli *et al.* 2001; Kieft *et al.* 2002).



Obrázek 4: Schéma HCV IRES. Převzato z (Honda *et al.* 1999)

Interakce malé podjednotky ribozomu s HCV IRES je zprostředkována doménami II a III. Doména II zajišťuje interakci s eIF5, který slouží jako GAP pro eIF2-GTP-tRNA_i a je nezbytný jak pro iniciaci translace viru žloutenky typu C, i na čepičce závislé (viz 3.4 Iniciace translace u eukaryot). Doména II dále usměřňuje

polohu domény IV v rámci komplexu s malou podjednotkou ribozomu. Doména III zajišťuje interakci s eIF3, který je nezbytný pro vazbu IRES k malé podjednotce ribozomu (viz Obrázek 5) (Sizova *et al.* 1998; Kieft *et al.* 2001; Locker *et al.* 2007; Berry *et al.* 2010).

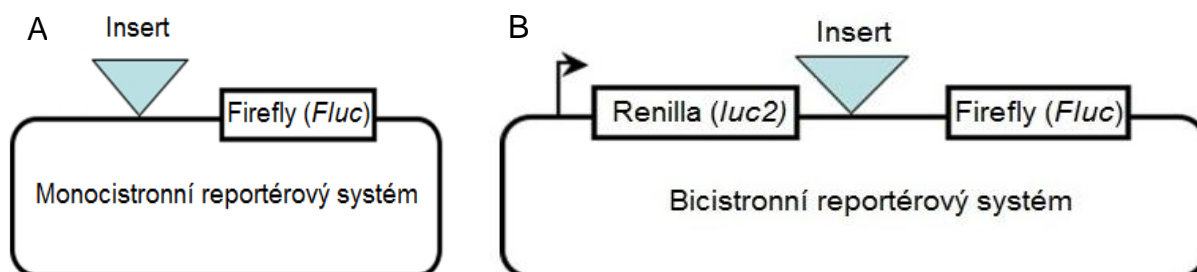


Obrázek 5: Schéma iniciace translace HCV pomocí vnitřního vazebného místa pro ribozom, IRES. Malá podjednotka ribozomu je rozpoznána IRES, která navíc váže eIF2-GTP-tRNA_i a eIF3. Po rozpoznání iniciačního kodónu molekulou tRNA_i, dojde k hydrolýze GTP na eIF2 pomocí eIF5, k procesu dopomáhá doména II. Interakce eIF5B dovoluje vazbu s velkou podjednotkou ribozomu, vzniká tak kompletní komplex ribozomu s tRNA_i v P místě. Tento stav je nezbytný pro následný proces elongace. Upraveno podle (Khawaja *et al.* 2015).

3.6 Metody studia IRES

Hlavní metodou zkoumání IRES je monocistronní nebo bicistronní reportérový systém (viz Obrázek 6). Jedná se o cirkulární molekuly DNA, které obsahují naklonovanou sekvenci, která by mohla obsahovat vnitřní vazebné místo pro ribozom. Tato sekvence je naklonována před cistron, který dává vzniku reportérové molekule, detekovatelnému proteinu. Tímto reportérovým proteinem často používána

luciferáza (*Renilla* luciferáza, respektive *Firefly* luciferáza) (Vopálenský *et al.* 2008). Problematika reportérových systémů a nástrahy spojené s výzkumem IRES jsou zajímavým způsobem popsány v přehledovém článku (Gilbert 2010).



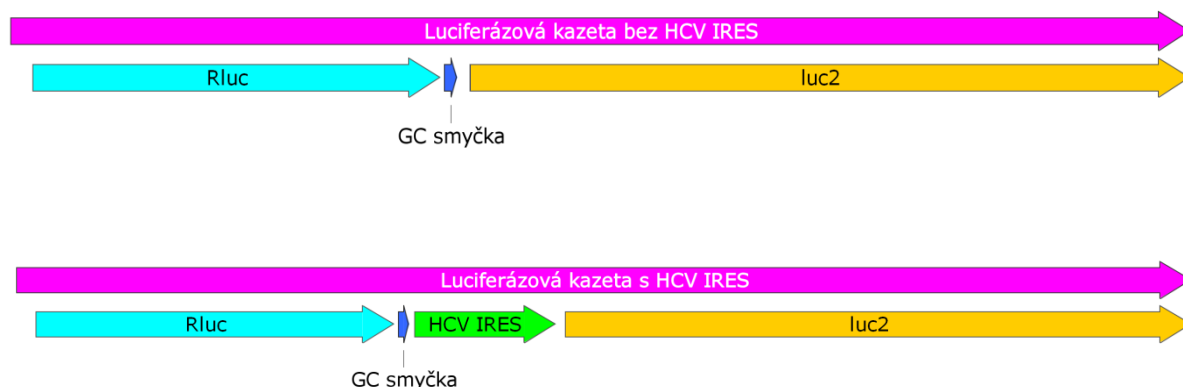
Obrázek 6: Schéma vektorů pro (A) monocistronní a (B) bicistronní reportérový systém. Tyto systémy jsou hojně používány pro studium IRES. Zahrnují vektor, do kterého je naklonována studovaná sekvence (Insert). Dále obsahují reportérový cistron, který dává vznik proteinu. Tento protein je možno detekovat. V případě luciferáz se jedná o detekci luminiscence. Bicistronní reportérový systém vyžaduje terminátor translace před insertem, kterým může být buď stop kodon, nebo pevná sekundární struktura, neprostupná pro postup ribozomu. Šipka označuje promotor. Upraveno podle (Gilbert 2010).

V monocistronním systému je situace jednoduchá, zkoumaná sekvence je naklonována do vektoru před reportérový cistron. Následně je pozorována produkce reportérového proteinu v transfekovaném systému. Bicistronní reportérový systém je dobrou volbou v případě, že je cílem porovnávat iniciaci translace závislou na čepičce s iniciací translace, která je závislá na IRES (Gilbert 2010).

Obě luciferázy, *Firefly* i *Renilla* jsou dobře popsány enzymy a jejich aktivitu je možno detekovat za přítomnosti substrátů ihned po proteosyntéze. Společnost *Promega*TM vytvořila komerčně dostupnou soupravu s názvem *Dual-Luciferase[®] Reporter assay system* (viz 4.1.4 Komerční soupravy, 4.2.10.8 Duální luciferázový test). Tato souprava dovoluje dvoukrokový přístup měření luciferáz, kdy nejdříve dojde k přidání substrátu pro *Firefly* luciferázu a změření její aktivity ve vzorku, ve druhém kroku dojde k umlčení aktivity *Firefly* luciferázy spolu s přidáním substrátu pro *Renilla* luciferázu a následně je možné měřit aktivitu *Renilla* luciferázy (Matthews *et al.* 1977; Wood *et al.* 1984).

Bicistronní reportérový systém (neboli bicistronní reportérová kazeta) byl použit i během výzkumu prezentovaném v této diplomové práci (viz Obrázek 7).

Jako negativní kontrolu jsme použili kontrolní reportérovou kazetu, která neobsahuje HCV IRES.



Obrázek 7: Schéma luciferázové kazety s HCV IRES a negativní kontroly bez HCV IRES. Obě kazety obsahují GC smyčku, což je sekvence, která tvoří sekundární strukturu, nepřekonatelnou pro postup ribozomu na mRNA. Iniciace translace cistronu pro luc2 je tak závislá na HCV IRES.

Největším problémem studia vnitřních vazebných míst pro ribozom je současný výskyt kryptických promotorů v totožné sekvenci. To znamená, že sekvence, která je schopná ve formě RNA iniciovat translaci, má potenciál iniciovat transkripci ve formě DNA. Tento fakt bohužel nepomáhá ve studiu IRES, proto je nezbytné připravit kvalitní kontroly, díky kterým by se daly objevit oba výše zmíněné faktory. Tento pozorovaný jev se nevyhnul ani HCV IRES, který taktéž obsahuje kryptický promotor. Avšak kryptický promotor v HCV IRES má nízkou účinnost a je možno ho ignorovat, jelikož množství vzniklých mRNA díky tomuto promotoru bude minimální. Navíc bylo zjištěno, že i samotné cistrony, tak často používané sekvence pro luciferázy, mohou obsahovat kryptické promotory (Dumas *et al.* 2003; Vopálenský *et al.* 2008; Gilbert 2010).

3.7 MAPK/ERK kaskáda a regulace translace

Jednou z klasických signálních kaskád, které přímo regulují translaci je mTOR. Jedná se o signalizační uzel, který integruje informace z membrány reprezentované prorůstovými cytokiny a mitogeny, detekci hladiny vnitrobuněčné energie a základních staveních bloků, aminokyselin. Všechny tyto impulzy se střetávají v aktivaci mTORc1, respektive mTORc2 (z ang. *mammalian target of rapamycin complex 1/2*) (Dennis *et al.* 2001; Ballif *et al.* 2005; Sancak *et al.* 2008).

Aktivace mTORc1 je zprostředkovaná mechanismem zahrnující malý G protein Rheb, který v aktivní formě s navázaným GTP interaguje s komplexem mTORc1 a aktivuje jej. Protein Rheb (z ang. *Ras homolog enriched in brain*) je pod regulací proteinů TSC1 a TSC2 (z ang. *Tuberous sclerosis proteins 1/2*). Protein TSC2 je GAP, aktivuje GTPázovou aktivitu Rheb proteinu, čímž jej převede do formy s navázaným GDP. V interakci s GDP je protein Rheb neaktivní a tím i komplex mTORc1 (Garami *et al.* 2003; Inoki *et al.* 2003; Tee *et al.* 2003; Urano *et al.* 2005).

Hlavní mechanismus jakým mTORc1 podporuje buněčnou translaci je fosforylace 4E-BPs (z ang. *4E-binding proteins*). Členové této rodiny jsou schopny vyvazovat eIF4E, čímž zamezí iniciaci translace zprostředkované 5'čepičkou na molekulách mRNA (viz 3.4 Iniciace translace u eukaryot). Fosforylace 4E-BPs komplexem mTORc1 inhibuje schopnost těchto proteinů interagovat s iniciačním faktorem eIF4E (Gingras *et al.* 1999; Kim *et al.* 2002).

Proteinkináza ERK1/2 fosforyluje protein TSC2, čímž dochází k inaktivaci fosforylovaného proteinu. Dále dokáže proteinkináza ERK1 a ERK2 fosforylovat protein Raptor, který je nezbytnou součástí mTORc1. Raptor slouží k rozpoznání a interakci se substrátovými proteiny mTORc1. Tato fosforylace není aktivační, podporuje však aktivitu mTORc1 (Hara *et al.* 2002; Ballif *et al.* 2005; Carriere *et al.* 2011). Za použití několika nízkomolekulárních inhibitorů MAPK/ERK bylo zjištěno, že aktivita této signální kaskády je nezbytná pro fosforylaci určitých aminokyselinových zbytků na 4E-BP. Nejspíše se nejedná o přímou fosforylaci zprostředkovanou ERK1/2. Pravděpodobně inhibováním proteinkináz ERK1/2 došlo k snížení aktivity mTORc1 skrze TSC1/2 komplex (viz výše) (Herbert *et al.* 2002).

Proteinkinázy MAPKAPK3 a MNK1/2 jsou substráty ERK1/2, tyto enzymy jsou spojeny s iniciací translace HCV IRES. Proteinkináza MNK1/2 fosforyluje eIF4E, čímž dochází k částečné inhibici translace buněčných mRNA závislých na čepičce, ale zároveň také se zvýšenou translací prozánětlivých cytokinů, matrixových metaloproteáz a faktorů buněčného přežívání. Samotná MAPK/ERK částečně reguluje tyto procesy. Na druhou stranu jsou výše zmíněné faktory spojovány s buněčnou transformací. Navíc je fosforylace proteinu eIF4E spojena se změnou translatovaných mRNA, tedy některé mRNA jsou translatované více než jiné. Po výše zmíněné kovalentní modifikaci jsou preferovány mRNA, které souvisí zejména s

migrací, přežíváním a nevyhnutelně i s tumorigenezí (Wang *et al.* 1998; Waskiewicz *et al.* 1999; Knauf *et al.* 2001; Zuberek *et al.* 2003; Ueda *et al.* 2004; Topisirovic *et al.* 2004; Wendel *et al.* 2007; Furic *et al.* 2010; Ngo *et al.* 2013).

Některé ze skupiny mRNA preferovaných za výše uvedených podmínek obsahují vnitřní vazebné místo pro ribozom, tedy buněčnou obdobu IRES. Takovými příklady jsou mRNA pro VEGF-C nebo cyklin D1. Vzhledem k tomu, že protein eIF4E v principu není nutný pro iniciaci translace závislé na IRES, vyvstává otázka, jak je tato proteoforma spojena s translací nezávislé na čepičce. V případě cyklinu D1 bylo prokázáno, že fosforylovaná forma eIF4E dopomáhá k přednostnímu transportu mRNA pro cyklin D1 z jádra do cytoplazmy, kde je translatována závisle na IRES. Jestli se tímto způsobem uplatňuje fosforylovaná forma eIF4E i u ostatních mRNA s buněčným IRES není zřejmé (Rousseau *et al.* 1996; Akiri *et al.* 1998; Huez *et al.* 1998; Shi *et al.* 2005; Furic *et al.* 2010). Možnost vztáhnout poznatky i na jiné mRNA s IRES stěhuje fakt, že charakter buněčných IRES je velmi rozmanitý. Navíc se stále objevují názory, které schopnosti hlavně buněčných IRES snižují. Namísto struktury, jež dokáže iniciovat translaci je některými autory považováno vnitřní vazebné místo pro ribozom jako posilovač iniciace translace závislé na čepičce (Komar & Hatzoglou 2005; Gilbert 2010).

V porovnání s buněčnými IRES jsou tyto virové elementy poměrně tradičně přijímány, nejspíše i díky vyššímu množství informací. Některé buněčné IRES vyžadují proteiny eIF4A, eIF4G a eIF3 (Spriggs *et al.* 2009). Eukaryotický iniciační faktor 3 je zároveň nezbytný pro iniciaci translace závislé na HCV IRES (viz kapitola 3.5 Iniciace translace zprostředkovaná HCV IRES).

Zajímavými výsledky přispěla do poznání o iniciaci translace nezávislé na čepičce a MAPK/ERK signální kaskády práce Casanova *et al.* z roku 2012. Podle výsledků této práce dochází po selektivním umlčení ERK1 pomocí siRNA k poklesu iniciace translace závislé na VEGF-A IRES. Proteinkináza ERK1 se tedy v této situaci jeví jako pozitivní regulátor iniciace translace závislé na VEGF-A IRES. Ještě pozoruhodnějším výsledkem je vliv proteinkinázy ERK2, ty jsou z širšího hlediska nejednoznačné, ačkoli se dá s určitou pravděpodobností říct, že vliv enzymu ERK2 na iniciaci translace závislé na VEGF-A IRES není totožný s vlivem proteinu ERK1 na stejnou událost. Při umlčení ERK2 pomocí tří různých siRNA došlo ve dvou ze tří

případů k navýšení iniciace translace závislé na VEGF-A IRES (ERK2 se tedy choval jako negativní regulátor), zatímco v jednom případě se výsledek shodoval s výsledkem umlčení proteinu ERK1 (Casanova *et al.* 2012).

Výše zmíněná práce poskytuje zajímavý pohled propojující iniciaci translace nezávislou na čepičce a rozdílnost proteinkináz ERK1 a ERK2. Autor práce z roku 2012 neposkytuje žádnou teorii, která by dané pozorování vysvětlila, čímž otevírá pole působnosti pro výzkumné skupiny, které by propojení těchto témat chtěli studovat.

4 Materiály a metody

4.1 Materiály

4.1.1 Chemikálie

Název	Výrobce	Označení
agar	ForMedium™	
agarosa	Serva	
akrylamid	Serva	
ampicilin	Sigma	
bovinní sérum albumin	Serva	BSA
bromfenolová modř	Serva	BFB
deionizovaná voda		ddH ₂ O
diethylpyrokarbonát	Sigma	DEPC
dimetylsulfoxid	Sigma	DMSO
dodecylsíran sodný	Serva	SDS
etanol	Lach-Ner	
ethidium bromid	Sigma	EtBr
glycerol	Sigma	
glycin	serva	
hydroxid sodný	Lachema	NaOH
chlorid hořečnatý	Sigma	MgCl ₂
chlorid sodný	Lach-Ner	NaCl

chloroform	Lach-Ner	
isopropanol	Lach-Ner	
kvasinkový extrakt	Sigma	
kyselina ethylendiamintetraoctová	Serva	EDTA
kyselina chlorovodíková	Lachema	HCl
kyselina p-kumarová	Sigma	
luminol	Sigma	
m ⁷ GTP 100mM		
metanol	Lach-Ner	
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin	Sigma	TEMED
N,N'-methylenbisakrylamid	Serva	
octan draselný	Sigma	KAc
pepton	Sigma	
peroxid vodíku	Sigma	H ₂ O ₂
persíran amonný	Serva	APS
Sunar Complex 1	Hero	
tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva	Tris
tris(hydroxymethyl)-aminomethan chlorid	Serva	Tris-HCl
Tween 20	Serva	
β-merkapt ethanol	Sigma	

4.1.2 Roztoky

1x blotovací roztok: 20 % (v/v) metanol; 0,29 % (w/v) glycin; 0,58 % (w/v) Tris; 0,037 % (w/v) SDS

1x TBS: 20mM Tris; 150mM NaCl

2xTY médium s antibiotiky: 1,5% (w/v) peptonu; 1% (w/v) kvasinkový extrakt; 0,5% (w/v) NaCl; pH7 doplnit NaOH; vybrané antibiotikum 100 µg/ml ampicilin

Agarózové médium 2xTY s antibiotiky: 2xTY médium s antibiotiky; 2% (w/v) agar

30% roztok akrylamidu: 30% (w/v) akrylamid; 0,8% N,N'-methylenbisakrylamid, před prvním použitím nutno přefiltrovat.

4x Tris-HCl/SDS pH 6,8: 0,5M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS

4x Tris-HCl/SDS pH 8,8: 1,5M Tris-HCl; 0,4 % (w/v) SDS

4x Vzorkový pufr: 11,25 ml 1M Tris-HCl, 18 ml glycerol, 3,6g SDS. 12,15 ml ddH₂O.

50x TAE pufr: 24,2 % (w/v) Tris-HCl; 5,7 % (v/v) HCl; 10 % (v/v) 0,5 M EDTA-NaOH pH 8,0

5x SDS-PAAGE pufr: 25mM Tris; 192mM glycine; 0,1 % (w/v) SDS

6x vzorkový pufr pro agarósovou elektroforézu: 10mM Tris-HCl pH 7,6; 0,03 % (w/v) bromfenolová modř; 60 % (v/v) glycerol; 60mM EDTA-NaOH

blokovací roztok: 1x TBS; 0,5 % (v/v) Tween 20; 5 % (w/v) Sunar Complex 1

EDTA-NaOH: 0,5M roztok EDTA upravit pomocí NaOH na pH 8

odmývací roztok: 1x TBS; 0,5 % Tween 20

převrstvovací pufr pH 8,8: 0,375M Tris-HCl; 0,1 % (w/v) SDS

roztok kyseliny p-kumarové: 93,5mM kyselina p-kumarová rozpuštěna v DMSO

roztok luminolu: 250mM luminol v DMSO

TRN: 58 U/mg ribonukleáza A; 0,1 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,045mM NaCl

4.1.3 Komerční pufrы a roztoky

pufr pro restrikční endonukleázy Orange (Fermentas[®])

pufr pro restrikční endonukleázy Red (Fermentas[®])

pufr pro restrikční endonukleázy Yellow (Fermentas[®])

pufr pro Taq polymerázu (Roche[®])

PBS (Lonza[®])

4.1.4 Komerční soupravy

Název	Výrobce
DNA Clean & Concentrator TM -5	Zymo Research [®] .
Dual-Luciferase [®] Reporter assay system	Promega TM
Fast Start SYBR Green Master	Roche TM
Flp-In TM System	Invitrogen TM
Plasmid DNA Extraction Midi EndoToxinFree	FavorPrep TM
Plasmid extraction Mini Kit TM	FavorPrep TM
TOPO [®] TA Cloning [®] Kit	ThermoFischer TM Scientific
TranscriptAid TM T7	ThermoFischer TM Scientific
High Yield Transcription Kit	ThermoFischer TM Scientific
TURBO DNA-free TM Kit	Ambion [®]
Wheat germ extract TM	Promega TM
TRI [®] reagent	Sigma [®]

4.1.5 Enzymy

Název	Koncentrace	Výrobce
<i>Eco105I</i>	10 U/L	ThermoFischer TM Scientific
M-MuLV Rev. Transcriptase	20 U/μl	Fermentas [®]
<i>NotI</i>	10 U/L	ThermoFischer TM Scientific
Taq DNA polymeráza	2,5 U/μl	Fermentas [®]
<i>XmaJI</i>	10 U/L	ThermoFischer TM Scientific
Ribonukleáza A	58U/mg	Sigma [®]

4.1.6 Protilátky

Název	Typ	Zdroj
Anti-beta actin antibody	Monoklonální myš IgG1	Abcam [®] Santa Cruz Biotechnology [®] / Dr. Vomastek
ERK 1 Antibody (K-23)	Polyklonální králík IgG	
ERK1 Antibody (ERK-6B11)	Monoklonální myš IgG1	Ambion [®] Dr. Vomastek, tvůrce: M.Weber
ERK2 antibody (B3B9)	Monoklonální myš IgG2a	

Goat anti mouse IgG - HRP	Monoklonální IgG	Santa Cruz [®]
p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) Mouse mAb	Monoklonální myš IgG1	Cell Signaling technology [®] /Dr. Vomastek
Goat anti rabbit IgG - HRP	Polyklonální IgG	Thermofisher [™] Scientific

4.1.7 siRNA

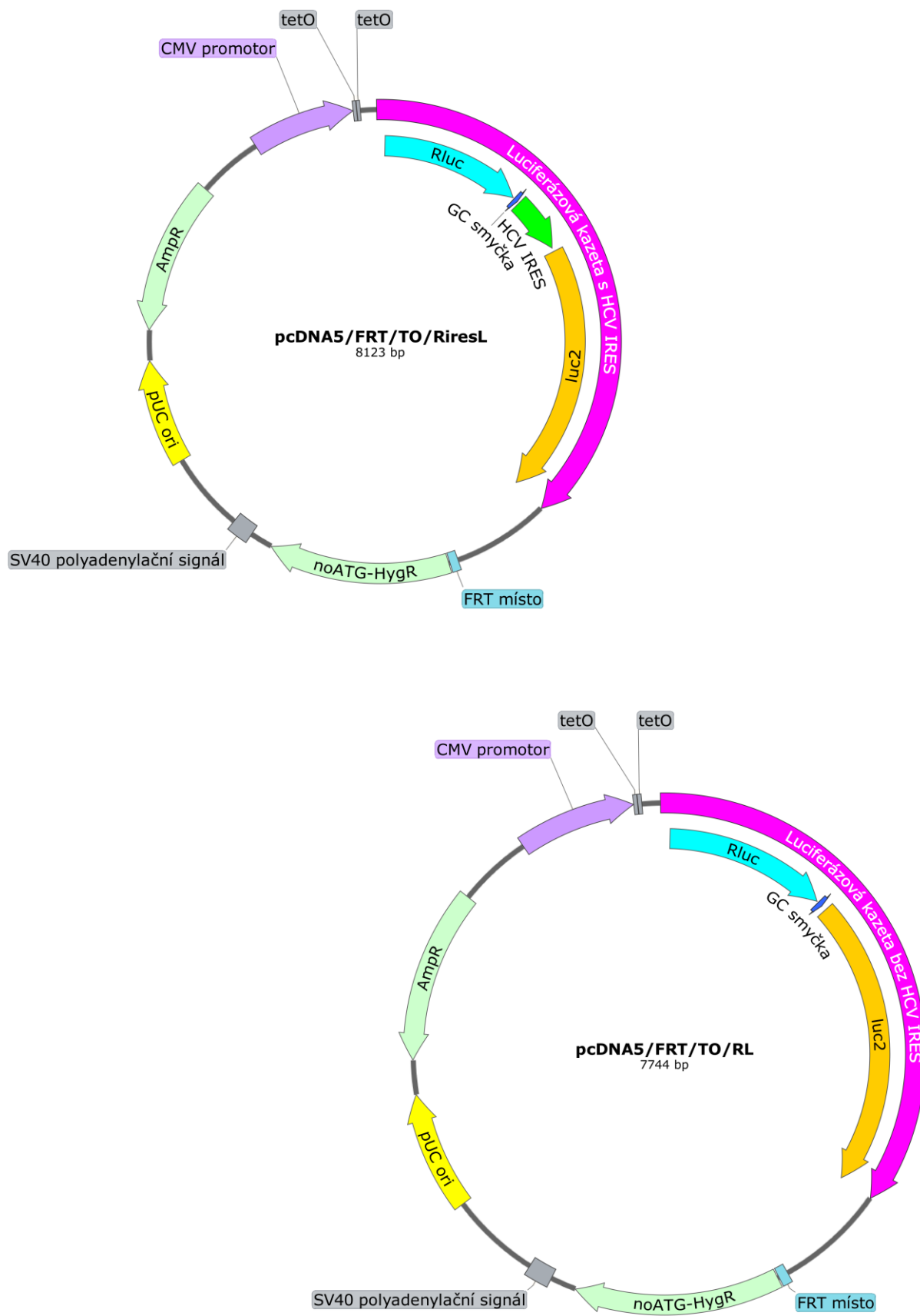
Cílová mRNA genu	Sekvence sense vlákna siRNA, 5' - 3'	Označení v této práci
MAPK3	GGAUCAGCUCAACCACAUUtt	siERK1
MAPK3	GGACCGGAUGUUAACCUUUtt	siRNA ERK1/ siERK1_H
MAPK3	GACCGGAUGUUAACCUUUAtt	siERK1_rat
MAPK1	CAACCAUCGAGCAAAUGAAtt	siRNA ERK2/ siERK2_H
Scrambled siRNA		Scrambled

Cílová mRNA genu	Zdroj	siRNA ID#
MAPK3	<i>Sigma[®], Casanova et al.</i>	s11140
MAPK3	Ambion [®] , Dr. Hodný	s11141
MAPK3	Dr. Vomastek	
MAPK1	Ambion [®] , Dr. Hodný	s11138
Scrambled siRNA	Ambion [®]	

4.1.8 Vektory

Název	Výrobce
pcDNA [™] 5/FRT/TO/RiresL	Laboratoř biochemie RNA
pcDNA [™] 5/FRT/TO/RL	Laboratoř biochemie RNA
TOPO_RiresL	Laboratoř biochemie RNA
TOPO_RL	Laboratoř biochemie RNA

Schéma vektorů pcDNATM 5/FRT/TO/RiresL a pcDNATM 5/FRT/TO/RL je na obrázku 8. Schéma vektorů TOPO_RiresL a TOPO_RL je součástí kapitoly 5.4.2 Sekvenování reportérových kazet a příprava zásobních vzorků.



Obrázek 8: Schéma vektorů pcDNATM 5/FRT/TO/RiresL a pcDNATM 5/FRT/TO/RL.

4.1.12 Kultivační média a chemikálie

Název	Výrobce
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Sigma [®]
Opti-MEM [™]	Gibco [®]
100x Antibiotic-Antimycotic [™] (10000 U/ml penicilin, 10000 µg/ml streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B)	Gibco [®]
Hygromycin B, 50mg/ml	ThermoFischer [™] Scientific
Trypsin-EDTA, fenolová červeň	Gibco [®]
FBS, fetální bovinní sérum	Biochrom [®]

4.1.13 Transfekční činidla

Název	Výrobce
TurboFect [™]	ThermoFischer [™] Scientific
Lipofectamin [®] 2000	ThermoFischer [™] Scientific
RiboCellin [®]	BioCellChallenge [™]
Lipofectamin [®] RNAiMAX Reagent	Invitrogen [™]

4.1.14 Standardy molekulových hmotností

GeneRuler 1 kb, DNA Ladder	ThermoFischer [™] Scientific
----------------------------	---------------------------------------

4.2 Metody

4.2.1 Práce s mikroorganismy

4.2.1.1 Transformace buněk *E.coli* metodou elektroporace

- Do vychlazené elektroporační kyvety (vzdálenost elektrod činila 2 mm), jsme přidali 40 µl elektrokompetentní suspenze bakteriálních buněk *E.coli* XL-1 *Blue*.
- K bakteriální suspenzi v elektroporační kyvetě jsme přidali 1 µl DNA.
- Elektroporační kyvetu jsme vložili do přístroje *Gene Pulser Xcell[™]* (BIO-RAD) o kapacitě 25 µF.

- Aplikovali jsme puls o napětí 2,5 kV při odporu 200 Ω .
- Okamžitě po ukončení pulsu jsme k suspenzi přidali 1 ml 2xTY média. Tuto směs jsme přenesli do 1,5ml mikrozkuhavky.
- Mikrozkuhavku jsme s obsahem inkubovali po dobu 60 minut při teplotě 37°C v termo-třepačce TS-100C (*BIOSANTM*) při 550 otáčkách /minutu.
- Buněčná suspenze byla vyseta na Petriho misky s agarózovým médiem 2xTY se selekčním antibiotikem.
- Objem vyšeté suspenze činil 10 μ l, 100 μ l a celý zbytek suspenze.

4.2.2 Práce s buněčnými liniemi

4.2.2.1 Kultivace buněčných linií

Kultivace buněčných linií, probíhala za stálých podmínek, ve 37°C atmosféře s 5% CO₂. S buněčnými liniemi jsme manipulovali za přísných aseptických podmínek v laminárním flowboxu s hepafiltrem.

4.2.2.2 Pasážování buněčných linií

Adherentní buněčné linie byly standardně kultivovány na 6cm Petriho misce upravené pro kultivaci buněčných linií (*TPP[®]*) v doporučeném objemu média DMEM podle *American Type Culture Collection (ATCC[®])*. Ve většině případů se jednalo o 5 ml média DMEM s 10% FBS se směsí antibiotik a antimykotik na výše zmíněnou Petriho misku.

Pasážování adherentních buněčných linií probíhalo následovně.

- Buněčnou linie jsme nechali růst do téměř 100% konfluence, které buňky zpravidla dosáhly do dvou až tří dnů po pasáži.
- Odsáli jsme médium z Petriho misky a přidali jsme 5 ml PBS (*Lonza[®]*) nahřátého na 37°C. Tekutinou jsme několika opatrnými pohyby opláchli povrch misky. PBS jsme následně odsáli.
- Na obnažené adherentní buňky jsme přidali 500 μ l roztoku trypsinu s EDTA (viz 4.1.12 Kultivační média a chemikálie). Takto ošetřené buňky jsme nechali

inkubovat po dobu 5-10 minut v termoboxu při 37°C. Během této doby došlo k uvolnění adherentních buněk ze dna Petriho misky.

- Po inkubaci jsme k volným buňkám přidali 4,5 ml média DMEM s 10% FBS a antibiotiky a antimykotiky (viz 4.1.12 Kultivační média a chemikálie). Z tohoto objemu jsme přenesli 1 ml do 4 ml média DMEM a 10% FBS a antibiotiky na nové 6cm Petriho misce.

4.2.2.3 Skladování buněčných kultur

Dlouhodobé skladování buněčných kultur se uskutečňuje v nádobě obsahující tekutý dusík. Pro skladování je potřeba udržovat buňky ve speciálně složeném médiu s kryoprotektivy, aby nedošlo k jejich poškození. Médium s kryoprotektivem má toto složení: 70% DMEM, 20% FBS, 10% DMSO. Jedna kryozkumavka, používaná pro uskladnění buněčné kultury, obsahuje počet buněk z dvou kultivačních 6cm Petriho misek.

- Po ošetření buněk trypsinem a přidání média DMEM s 10% FBS a směsí antibiotik a antimykotik jsme tuto směs centrifugovali 5 minut/ 300 g.
- Odsáli jsme supernatant a peletu jsme promyli 1 ml PBS (*Lonza*[®]). Promytou suspenzi jsme opět centrifugovali 5 minut/ 300 g.
- Odsáli jsme supernatant. K peletě jsme přidali příslušný objem média s kryoprotektivem. Do jedné kryozkumavky se přidává 1 ml buněk v médiu s kryoprotektivem.
- Naplněné kryozkumavky byly inkubovány jeden den v zmrazovacím boxu *Mr. Frosty (Nalgene*[®]) uskladněného v -80°C.
- Následující den byly buňky v kryozkumavce přeneseny do skladovací nádoby s tekutým dusíkem.

Při rozmrazování jsme postupovali následovně.

- Kryozkumavku s buněčnou linií v roztoku média s kryoprotektivy jsme ponechali v teplotě místnosti, dokud nedošlo k rozmrazení roztoku.
- Výše zmíněný roztok jsme po rozmrazení přenesli do centrifugační zkumavky s 9 ml média DMEM a 10%FBS. Směs jsme centrifugovali 10 minut/ 300 g.

- Supernatant jsme odstranili. K buněčné peletě jsme přidali 9 ml média DMEM s 10%FBS a směsí antibiotik a antimykotik. 5 ml směsi této směsi jsme přenesli na 6 cm Petriho misku.
- Buňky jsme inkubovali podle (4.2.2.1 Kultivace buněčných linií).

4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií

Transfekce jsme uskutečnili na jednotlivých jamkách na 24 jamkové destičce (*TPP*[®]), ve které se buněčné linie zpravidla kultivují v 500 µl až 1 ml objemu média DMEM s 10% FBS a roztokem antibiotik a antimykotik.

- Buněčnou linii jsme nechali růst do téměř 100% konfluence, které buňky zpravidla dosáhly do dvou až tří dnů po pasáži.
- Odsáli jsme médium z Petriho misky a přidali jsme 5 ml PBS nahřátého na 37°C. Tekutinou jsme několika opatrnými pohyby opláchli povrch misky. PBS jsme následně odsáli.
- Na obnažené adherentní buňky jsme přidali 500 µl roztoku trypsinu. Takto ošetřené buňky jsme nechali inkubovat po dobu 5-10 minut v termoboxu v 37°C. Během této doby došlo k uvolnění adherentních buněk ze dna Petriho misky.
- Po inkubaci jsme k volným buňkám přidali 4,5 ml média DMEM s 10% FBS a roztokem antibiotik. 4 ml z tohoto objemu jsme přidali k 16 ml média DMEM s 10% FBS a roztokem antibiotik a antimykotik.
- Do jednotlivých jamek 24 jamkové destičky jsme přidali 500 µl média DMEM s 10% FBS a roztokem antibiotik a antimykotik a 500 µl média s buňkami, které jsme připravili v předchozím kroku.
- Po cca 18-20 hodinách byla buněčná kultura v optimální konfluenci (70-80%) pro transfekci.

4.2.2.5 Transfekce buněčné linie molekulami DNA

Pro transfekci buněčných linií jsme použili komerční transfekční reagentii *Lipofectamin*[®] 2000 (*Thermo Scientific*TM). Transfekovali jsme buněčnou linii

připravenou podle (4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií). Při transfekci jsme postupovali podle protokolu k produktu od výše zmíněné firmy.

- K 50 μ l média Opti-MEM jsme přidali 0,8 μ g vektorové DNA.
- K 50 μ l média Opti-MEM jsme přidali 2 μ l transfekčního činidla *Lipofectamin*[®] 2000.
- Oba výše zmíněné roztoky jsme inkubovali 5 minut v teplotě místnosti.
- Následně jsme přidali roztok DNA do roztoku s transfekčním činidlem, krátce jsme roztok vortexovali a nechali inkubovat po dobu 20 minut v teplotě místnosti.
- Po inkubaci jsme přidali 100 μ l roztoku na jamku s buněčnou linií na 24 jamkové destičce.

4.2.2.6 Transfekce buněčné linie molekulami RNA

Buněčnou linii jsme transfekovali pomocí jednoho ze dvou transfekčních činidel používaných v naší laboratoři, *Lipofectamin*[®] 2000 (*Thermo Scientific*TM), případně *RiboCellin*[®] (*BioCellChallenge*TM). V obou případech jsme postupovali podle protokolu jednotlivých produktů.

Lipofectamin[®] 2000 (*Thermo Scientific*TM)

- K 50 μ l média OptiMEM jsme přidali 1 μ l *Lipofectamin*[®] 2000.
- K 50 μ l média OptiMEM jsme přidali 2 μ l vzorku RNA.
- Obě směsi jsme ponechali po dobu 10 minut v teplotě místnosti.
- Po inkubační době jsme přidali roztok RNA k roztoku s transfekčním činidlem. Vzniklou transfekční směs jsme inkubovali po dobu 5 minut v teplotě místnosti.
- 100 μ l směsi jsme transfekovali buněčnou linii rostoucí na jedné jamce v 24 jamkové destičce (viz 4.2.3 Příprava pro transfekci buněčných linií).

RiboCellin[®] (*BioCellChallenge*TM)

- 1,5 μ l vzorku RNA jsme přidali k 96,5 μ l PBS (*Lonza*[®]). Nechali jsme 5 minut inkubovat v teplotě místnosti.

- Ke směsi RNA s PBS jsme přidali 2 µl transfekčního činidla *RiboCellin*[®].
- Nechali jsme inkubovat 5 minut v teplotě místnosti.
- 100 µl směsi jsme transfekovali buněčnou linii rostoucí na jedné jamce v 24 jamkové destičce (viz 4.2.3 Příprava pro transfekci buněčných linií).

4.2.2.7 Transfekce buněčné linie siRNA

K transfekci buněčných linií siRNA, jsme v některých případech použili transfekční činidlo *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent* (*Invitrogen*[™]) nebo *RiboCellin*[®] (*BioCellChallenge*[™]). Jaké transfekční činidlo bylo použito je uvedeno v jednotlivých popisech experimentů.

Transfekce 10nM siRNA, *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent* (*Invitrogen*[™])

- K 50 µl média OptiMEM jsme přidali 1 µl 10 µM siRNA.
- K 50 µl média OptiMEM jsme přidali 3 µl transfekčního činidla *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent*.
- Oba výše zmíněné roztoky jsme nechali inkubovat 5 minut v teplotě místnosti.
- Po inkubační době jsme roztok siRNA přidali k roztoku transfekčního činidla. Směs jsme nechali 5 minut inkubovat v teplotě místnosti.
- 100 µl transfekční směsi bylo aplikováno k 900 µl média v jedné jamce s adherentními buňkami v 24 jamkové destičce připravených podle (viz 4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií).

Transfekce 10nM siRNA trypsinizovaných buněk, *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent* (*Invitrogen*[™])

- K 50 µl média OptiMEM jsme přidali 1 µl 10 µM siRNA.
- K 50 µl média OptiMEM jsme přidali 3 µl transfekčního činidla *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent*.
- Oba výše zmíněné roztoky jsme nechali inkubovat 5 minut v teplotě místnosti.
- Po inkubační době jsme roztok siRNA přidali k roztoku transfekčního činidla. Směs jsme nechali 5 minut inkubovat v teplotě místnosti.

Během inkubačních časů výše zmíněné přípravy roztoků, jsme ošetřili buňky podle následujícího postupu:

- Adherentní buněčnou linii v 24 jamkové destičce připravenou podle kapitoly 4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií, jsme ošetřili 100 μ l roztoku trypsinu s EDTA.
- Po inkubační době 5 minut jsme k jamce s uvolněnými buňkami ošetřeným výše zmíněným roztokem přidali 900 μ l média DMEM s 10%FBS. Směs jsme přenesli do 1,5ml mikrozkušavky a centrifugovali 3 minuty/ 400g.
- Odstranili jsme supernatant. Peletu jsme pomocí pipety promyli 1 ml PBS. Směs jsme centrifugovali 3 minuty/ 400g.
- Odstranili jsme supernatant. K peletě jsme přidali 900 μ l média DMEM s 10%FBS a směsí antibiotik a antimykotik. Takto vzniklou směs jsme vrátili do původní jamky na 24 jamkové destičce.
- 100 μ l transfekční směsi bylo aplikováno k 900 μ l média v jedné jamce s trypsinizovanými adherentními buňkami v 24 jamkové destičce (viz 4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií).

Transfekce 5/20/40nM siRNA, *RiboCellin*[®] (*BioCellChallenge*TM)

- K 96,5 μ l PBS jsme přidali 1,5 μ l 5/20/40 μ M siRNA a 2 μ l transfekčního činidla *RiboCellin*[®] (*BioCellChallenge*TM).
- Transfekční směs jsme krátce zvortexovali.
- Transfekční směs jsme nechali po dobu 15 minut v teplotě místnosti.
- Do jamky s buněčnou linií a 900 μ l média jsme přidali 100 μ l transfekční směsi.

Transfekce kalcium fosfátovou metodou

- K 19,95 μ l TE pufru jsme přidali 0,83 μ l 20 μ M siRNA a 2,1 μ l roztoku CaCl₂-HEPES.
- K 20,8 μ l 2xHEBS pufru jsme přidali roztok připravený v předchozím kroce
- Mix jsme nechali inkubovat po dobu 30 minut v teplotě místnosti.
- Celý mix jsme přidali k 500 μ l média v 24 jamkové destičce s buňkami.
(pufry pro kalcium fosfátovou metodu jsme obdrželi, nepřipravovali jsme je, proto je neuvádíme v přípravě s ostatními roztoky).

4.2.2.8 Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií

Stabilně transfekovaná buněčná linie, je taková buněčná linie, která obvykle obsahuje expresní kazetu integrovanou do jaderného genomu. Stabilní buněčná linie pak umožňuje dlouhodobě exprimovat gen/geny ve vnesené kazetě bez nutnosti opakované transfekce linie vektorem s expresní kazetou.

4.2.2.8.1 Flp-In™ System a Flp-In™ T-REx™ Cell Line

Pro přípravu stabilně transfekovaných stabilních linií jsme použili *Flp-In™ System* od společnosti Invitrogen™ (viz 4.1.4 Komerční soupravy). Tento systém, využívající Flp rekombinázu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, je založen na mechanismu místně specifické rekombinace. Substrátem pro Flp rekombinázu jsou homologní sekvence o délce 34 bp označované jako FRT místa, na kterých dochází k reakci katalyzované výše uvedeným enzymem. Prvním krokem přípravy stabilní buněčné linie je vytvoření buněčné linie s integrovaným FRT místem v jaderném genomu za pomoci vektoru pFRT/*lacZeo*. Tento vektor nese gen pro rezistenci na antibiotikum Zeocin™ a detekční marker, gen pro enzym β -galaktosidázu (*LacZ*). Tento krok, nezbytný k přípravě stabilních linií s kazetou našeho zájmu, se dá obejít použitím komerčně dostupných stabilních linií, s již integrovaným vektorem pFRT/*lacZeo*. Jedná se například o *Flp-In™ T-REx™ Cell Line*, což je buněčná linie obsahující kromě integrovaného vektoru pFRT/*lacZeo* i integrovaný vektor nesoucí gen pro Tetracyklinový repressor (*TetR*) pod kontrolou lidského cytomegalovirového promotoru (CMV). *Flp-In™ T-REx™ Cell Line* (viz 4.1.11 Buněčné linie) tak dovoluje tvorbu stabilních buněčných linií, ale i regulovanou expresi genů kazety našeho zájmu v závislosti na použitém promotoru, v tomto případě promotoru kontrolovaného Tetracyklinovým represorem. Regulace exprese genů kazety zájmu pomocí tetracyklinu funguje pouze v případě, že je jako vektor nesoucí kazetu zájmu použit pcDNA™ 5/FRT/TO, který obsahuje operátorovou sekvenci tetO. Zmíněná operátorová sekvence je rozpoznávána a vázána proteinovým produktem genu *TetR*. Tato vazba zabraňuje expresi genů *downstream* od tetO sekvence.

Buněčná linie *Flp-In™ T-REx™* s integrovaným FRT místem exprimuje gen *LacZ* a gen rezistence na Zeocin™, který byl integrován spolu s vektorem

pFRT/*lacZeo*. FRT místo se nachází mezi iniciačním kodonem sekvence kódující *LacZ-ZeocinTM* a zbytkem sekvence. Buněčné linie nesoucí tuto kazetu mohou být selektovány na ZeocinTM. Integrace vektoru při selekci na ZeocinTM je náhodná.

Dalším krokem přípravy stabilních linií je vnesení vektoru pcDNATM 5/FRT/TO s naklonovanou expresní kazetou našeho zájmu. Tento vektor je transfekován společně s vektorem pOG44, jenž obsahuje kódující sekvenci pro Flp-rekombinázu pod kontrolou konstitutivního promotoru CMV. Vektor pcDNATM 5/FRT/TO obsahuje detekční znak v podobě genu pro hygromycinovou rezistenci (*HygR*). Tento detekční znak nabude svých vlastností až po integraci do FRT místa po místně specifické rekombinaci zprostředkované Flp rekombinázou. Důvodem této změny je absence promotoru a iniciačního kodónu před kódující sekvencí genu hygromycinové rezistence na vektoru pcDNATM 5/FRT/TO. Oba tyto atributy získá gen pro hygromycinovou rezistenci z kazety na integrovaném pFRT/*lacZeo* (viz výše).

Takto připravená stabilní buněčná linie je rezistentní na hygromycin B, citlivá na ZeocinTM a neexprimuje gen *LacZ* z integrovaného vektoru. Selektce a detekce transfekovaných buněk pak probíhá v jednom kroku a to sice rezistencí buněk na hygromycin B v médiu. Tyto vlastnosti má jen a pouze taková buňka, která prošla všemi kroky přípravy stabilních buněčných linií tímto systémem.

4.2.2.8.2 Příprava stabilních buněčných linií pomocí *Flp-InTM System a Flp-InTM T-RExTM Cell Line*

- *Flp-InTM T-RExTM* buněčnou linii jsme kultivovali na 6cm Petriho misce v médiu DMEM s 10% FBS a 5x *Antibiotic-AntimycoticTM* (viz 4.1.12 Kultivační média a chemikálie), po dobu dvou dnů, do cca 80% konfluence vhodné pro transfekci.
- Buňky na 6cm Petriho misce jsme transfekovali transfekční směsí, která obsahovala vektory pOG44 a pcDNATM 5/FRT/TO/RiresL (stejný postup byl aplikován i pro kontrolní kazetu pcDNATM 5/FRT/TO/RL, viz 4.1.8 Vektory) o celkovém množství 3 ug DNA v poměru 9:1, v 590 µl média OptiMEMTM a 12 µl TurboFectTM transfekční reagentie (viz 4.1.12 Kultivační média a chemikálie).

- Po 24 hodinách jsme buňky zpasážovali a přenesli na 10cm Petriho misku. Kde byly buňky kultivovány v médiu s hygromycinem B o koncentraci 100 µg/ml.
- Médium jsme měnili v tří denních intervalech. Během následujících tří týdnů jsme Petriho misku pravidelně pozorovali pod světelným mikroskopem ve snaze najít vznikající kolonie, které byly dále analyzovány.

4.2.3 Práce s DNA

4.2.3.1 Izolace vektorů z buněk *E.coli* XL-1 *Blue* pomocí komerční soupravy *Plasmid extraction Mini KitTM (FavorPrepTM)*

Postupovali jsme podle protokolu dodávaného s komerční soupravou *Plasmid extraction Mini KitTM (FavorPrepTM)*.

- Vybrané monokolonie byly přeneseny do Erlenmayerovy baňky s tekutým médiem 2x TY s vhodným selekčním antibiotikem (kanamycin nebo ampicilin). Bakterie se nechaly růst přes noc ve vodné lázni při teplotě 37°C. Během inkubace bylo nádobou třepáno rychlostí 150 otáček za minutu.
- Následující den jsme odebrali 3 ml média s narostlou bakteriální kulturou do centrifugační zkumavky. Vzorek jsme centrifugovali 1 minutu/ 11000g. Supernatant jsme odstranili.
- K buněčné peletě jsme přidali 200 µl pufru FAPD1 s přidanou RNázou A. Pipetováním byla peleta rozpuštěna.
- Po přidání 200 µl pufru FAPD2 jsme vzorkem několikrát pomalu otáčeli.
- Následně jsme vzorek inkubovali po dobu 5 minut v teplotě místnosti.
- Okamžitě po přidání 300 µl pufru FAPD3 jsme vzorek několikrát pomalu otočili.
- Vzorek jsme centrifugovali 5 minut/ 18000g. Supernatant jsme přenesli do FAPD kolony, která byla nasazena do sběrné mikrozukavky.
- Vzorek jsme centrifugovali 30 vteřin/ 11000g, roztok ve sběrné mikrozukavce byl odstraněn.
- Po přidání 400 µl pufru W1 do FAPD kolony jsme vzorek centrifugovali 30 vteřin/ 11000g. Roztok ve sběrné mikrozukavce byl odstraněn.

- Po přidání 700 μ l Promývacího pufru do FAPD kolony, jsme vzorek centrifugovali 30 vteřin/ 11000g. Roztok ve sběrné mikrozkušavce byl odstraněn.
- Vzorek byl centrifugován 3 minuty/ 18000g. FAPD kolonu jsme po centrifugaci přenesli do 1,5ml mikrozkušavky.
- Do středu FAPD kolony jsme přidali 50 μ l ddH₂O. Po dobu 1 minuty byl vzorek ponechán v teplotě místnosti.
- Vzorek jsme centrifugovali 1 minuta/ 18000g pro eluci vektorové DNA do 1,5ml mikrozkušavky.
- Vzorek jsme uskladnili v -20°C.
- Kontrolu kvality izolované DNA jsme zajistili pomocí agarózové DNA elektroforézy (viz 4.2.3.11 Agarózová elektroforéza DNA). Koncentraci izolované DNA jsme zjistili pomocí NanoDrop[®] ND-1000 *Spectrophotometer* (NanoDrop TechnologiesTM) (viz 4.2.3.3 Měření koncentrace DNA pomocí NanoDrop[®] ND-1000 *Spectrophotometer*).

4.2.3.2 Izolace vektorů z bakteriální kultur bez endotoxinů

Při izolaci vektorů z bakteriálních kultur bez endotoxinů jsme použili komerční soupravu *FavorPrepTM Endotoxin-Free Plasmid Extraction Midi Kit*. Při této izolaci jsme postupovali podle protokolu komerční soupravy.

- Bakteriální buňky jsme nechali přes noc pomnožit v 37°C za stálého třepání rychlostí 150 otáček/minutu v médiu se selekčním antibiotikem zvoleným dle potřeby.
- Následující den jsme bakteriální směs odebrali do 50ml falkonové zkumavky a zcentrifugovali 6000g/ 10 minut v 4°C.
- K pelěť jsme přidali 8 ml pufru PM1 s přidanou RNázou A a směs jsme resuspendovali vortexováním.
- Přidali jsme 8 ml pufru PM2 a falkonu se směsí jsme několikrát opatrně otočili.
- Ke směsi jsme přidali 8 ml vychlazeného pufru PM3 a směs jsme několikrát otočili.
- Směs jsme centrifugovali 15000g/ 15 minut při teplotě 4°C.

- Supernatant jsme přenesli do nové 50 ml falkonové zkumavky a přidali jsme 2,5 ml pufru PTR. Vzorkem jsme opatrně propipetovali. Vzorek jsme inkubovali na ledu po dobu 30 minut.
- Vzorek jsme po inkubaci přendali do kalibrované PM Midi kolony a nechali jsme směs protéct. Filtrát jsme odstranili. Kalibrace PM Midi kolony se uskutečňuje přidáním 5 ml PEQ pufru, který se nechá protéct. Následně je PM Midi kolona připravena k použití.
- Na PM Midi kolonu z předchozího kroku jsme přidali 12,5 ml pufru PW. Roztok jsme nechali protéct. Filtrát jsme odstranili.
- Kolonu PM Midi z předchozího kroku jsme přendali na novou, sterilní 50ml flakonovou zkumavku. Na kolonu jsme přidali 8 ml pufru PEL. Směs jsme nechali protéct.
- K filtrátu jsme přidali 0,75 objemu isopropanolu. Roztok jsme několikrát zamíchali převrácením.
- Roztok jsme centrifugovali 15000g/ 20 minut v 4°C.
- Peletu jsme promyli 5 ml 70% etanolu.
- Roztok jsme centrifugovali 5000g/ 10 minut ve 4°C.
- Supernatant jsme odstranili a peletu jsme nechali vyschnout
- Peletu jsme rozpustili v 300 μ l ddH₂O. Kvalitu a koncentraci jsme analyzovali na přístroji NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer* (viz 4.2.3.3 Měření koncentrace DNA pomocí NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer*). Integritu jsme ověřili na agarózové elektroforéze (viz 4.2.3.1 1 Agarózová elektroforéza DNA).

4.2.3.3 Měření koncentrace DNA pomocí NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer*.

Pro změření koncentrace vzorku DNA, jsme použili technologii NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer* (NanoDrop Technologies™). Koncentrace DNA byla zjišťována v objemu vzorku 1 μ l při vlnové délce 260 nm. V potaz byl vzat i poměr $A_{260/280}$ a $A_{260/230}$ jakožto indikátor čistoty vzorku DNA.

4.2.3.4 Přečištění vzorku DNA

Přečištění vzorku se běžně používá pro odstranění komponent směsi, které by mohly narušovat další reakce se vzorkovou DNA. Takovými komponenty často bývají enzymy, nukleotidy, primery nebo roztoky solí. Pro přečištění vzorku DNA jsme používali komerční soupravu *DNA Clean & ConcentratorTM-5* (Zymo Research®). Při přečištění jsme postupovali podle protokolu výše zmíněné soupravy.

- K objemu vzorku jsme přidali 2 objemy *DNA binding buffer*. Tuto směs jsme krátce zvortexovali.
- Směs jsme přenesli do *Zymo-SpinTM* kolony, která byla posazená v mikrozkuhavce.
- Směs jsme centrifugovali 30 vteřin/ 10000g.
- Do *Zymo-SpinTM* kolony jsme přidali 200 µl *DNA wash buffer*.
- Směs jsme centrifugovali 30 vteřin/ 10000g.
- Předchozí dva kroky jsme zopakovali.
- Na střed filtru v *Zymo-SpinTM* koloně jsme přidali 10 µl ddH₂O. Inkubovali jsme po dobu 60 vteřin v pokojové teplotě.
- *Zymo-SpinTM* kolonu jsme opatrně přenesli do nové 1,5ml mikrozkuhavky.
- Směs jsme centrifugovali 30 vteřin/ 10000g.
- Koncentraci přečištěné DNA jsme změřili pomocí technologie *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer* (*NanoDrop TechnologiesTM*) (viz 4.2.3.3 Měření koncentrace DNA pomocí *NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer*). Popřípadě jsme kontrolovali kvalitu vzorku na agarózové elektroforéze (viz Agarózová elektroforéza DNA).

4.2.3.5 Klonování DNA

4.2.3.6 PCR

Metodou PCR jsme připravili amplikony v reakci:

Templátová DNA	1 µl
T7_RLuc_fwd_2 (10pmol)	1,5 µl
T7_FLuc_rev (10pmol)	1,5 µl
Pufr Taq DNA polymeráza	2,5 µl
dNTPs (10mM)	0,5 µl
Taq DNA polymeráza + 5% Pwo polymeráza	1 µl
ddH ₂ O	17,5 µl

Program PCR přístroje měl toto nastavení:

1. 95°C	5 minut
2. 95°C	30 sekund
3. 55°C	30 sekund
4. 72°C	3 minuty 30 vteřin
Zpět do kroku 2.	30 opakování
5. 72°C	10 minut
6. 4°C	

4.2.3.7 Úprava konců amplikonů před klonováním DNA pomocí komerční soupravy *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*

Komerční souprava *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit* se dá aplikovat při klonování amplikonů vzniklých metodou PCR do *TOPO[®]* vektoru pCR4-TOPO v případě, že byla pro PCR použita *Taq* polymeráza. Tato polymeráza přidává na 3'konec amplikonů jeden netemplátový adenosin. Přidaný adenosin na 3'konci dvouvláknových DNA molekul je nezbytný pro naklonování do výše zmíněného vektoru. V případě, že byla pro PCR použita jiná polymeráza, nebo směs *Taq* polymerázy a jiné polymerázy s 3'→5'exonukleázovou opravnou aktivitou, je nezbytné, aby byl jednonukleotidový 3'koncový přesah v podobě adenosinu přidán

po amplifikační reakci. Před samotným přidáním přesahujícího nukleotidu je nezbytné, aby byly amplikony přečištěny. Směs nesmí obsahovat enzymy, které by mohli přidání nukleotidu narušovat. Vzorek jsme přečistili pomocí komerční soupravy *DNA Clean & ConcentratorTM-5* (Zymo Research®) (viz 4.2.3.4 Přečištění vzorku DNA). Přidání 3'koncového adenosinu jsme docílili reakcí katalyzovanou *Taq* polymerázou, která je schopna za reakčních podmínek popsaných níže přidat na 3'konec dvouvláknových DNA molekul jeden adenosin. Reakce se skládala z těchto komponent:

Směs z PCR reakce	2 µl
<i>Taq</i> polymeráza	0,5 µl
Pufr <i>Taq</i> DNA polymeráza	1 µl
dNTPs (10mM)	0,2 µl

Reakci jsme inkubovali v 72°C po dobu 10 minut. Takto upravený fragment z PCR jsme následně naklonovali do pCR4-TOPO vektoru pomocí komerční soupravy *TOPO® TA Cloning® Kit* (viz 4.2.3.8 klonování DNA komerční soupravou *TOPO® TA Cloning® Kit*).

4.2.3.8 Klonování DNA komerční soupravou *TOPO® TA Cloning® Kit*

Při práci s komerční soupravou *TOPO® TA Cloning® Kit* jsme postupovali podle doporučeného protokolu této soupravy.

- Reakční směs pro klonování pomocí komerční soupravy *TOPO® TA Cloning® Kit* se skládala z:

Vzorek DNA	1 µl
1x roztok solí ze soupravy	1 µl
<i>TOPO®</i> vektor pCR4-TOPO	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

- Reakci jsme inkubovali po dobu 5 minut v teplotě místnosti.

- Takto připravené vektory byly následně transformovány do bakterií metodou elektroporace (viz 4.2.1.1 Transformace buněk *E.coli* metodou elektroporace).

4.2.3.9 Štěpení DNA restrikčními endonukleázami

4.2.3.10 Dvojité štěpení DNA restrikčními endonukleázami

- Reakční směs pro štěpení DNA dvěma restrikčními endonukleázami se skládala z:

Restrikční endonukleáza 1	1 µl
Restrikční endonukleáza 2	1 µl
10x restrikční pufr	1,5 µl
RNáza I (TRN)	0,5 µl
DNA	1 µg
ddH ₂ O	Doplnit do 15 µl

- Reakci jsme inkubovali po dobu 60 minut v 37°C.
- Následně jsme provedli kontrolu kvality štěpní pomocí agarózové elektroforézy (viz 4.2.3.11 Agarózová elektroforéza DNA).

4.2.3.11 Agarózová elektroforéza DNA

- Požadované množství agarosu jsme rozpustili v objemu pufru 1x TAE pomocí mikrovlnné trouby (obvykle se jednalo o 0,8% agarosový gel (w/v)).
- Po zchlazení roztoku na teplotu přibližně 50-60°C, byl roztok nalit do formy, do roztoku jsme přidali 8 µl etidium bromidu a sestavu jsme zkompletovali přidáním hřebínku.
- Po ztuhnutí byl přenesen do elektroforetického přístroje a následně přelit 1x TAE puforem.
- Do jamek byly nanесeny vzorky s 4x vzorkovým puforem pro agarózovou elektroforézu v poměru 1:1, případně standard molekulových hmotností.
- Elektroforetický přístroj byl připojen do elektrického zdroje, které udržovalo konstantní napětí 7 V/cm po určitou dobu (45-60 minut).

- Gel byl vyfocen přístrojem *Gel Logic 112 Imaging System* (Kodak).
- Fotografie byla analyzována pomocí programu *Carestream* (Kodak).

4.2.3.12 Sekvenace DNA

Sekvenování DNA pro naši laboratoř zajistilo servisní centrum Laboratoř sekvenování DNA ve výzkumném ústavu BIOCEV. Na základně instrukcí, které servisní centrum poskytuje, jsme připravili část reakční směsi. Námi reakční směs byla připravena do 0,2ml mikrozkušavky a obsahovala:

Sekvenační primer (5 pmol)	1 μ l
Vektorová DNA	3 ng na každých 100 bp DNA
ddH ₂ O	Doplnit do 8 μ l

Reakci jako takovou provedlo výše zmíněné pracoviště. Sekvenační data, obdržená z pracoviště, jsme analyzovali pomocí programu *BenchlingTM*.

4.2.4 Práce s RNA

4.2.4.1 Agarosová elektroforéza RNA

- Požadované množství agarosu jsme rozpustili v objemu pufru 1x TAE pomocí mikrovlnné trouby (obvykle se jednalo o 1% agarosový gel (w/v)).
- Po zchlazení roztoku na teplotu přibližně 50-60°C, byl roztok nalit do formy, sestava byla zkompletována přidáním hřebínku.
- Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetického přístroje a následně přelit 1x TAE pufrem.
- Vzorek byl zmixován se směsí bromfenolové modři a etidium bromidu, zahřát po dobu 5 minut a následně rychle zchlazen.
- Do jamek byly nanесeny vzorky, případně standard molekulových hmotností.
- Elektroforetický přístroj byl připojen do elektrického zdroje, které udržovalo konstantní napětí 7 V/cm po určitou dobu (45-60 minut).
- Gel byl vyfocen přístrojem *Gel Logic 112 Imaging System* (Kodak).
- Fotografie byla analyzována pomocí programu *Carestream* (Kodak).

4.2.4.2 Linearizace vektorů pro *in vitro* transkripci

- Reakční směs pro linearizaci vektorů před *in vitro* transkripcí se skládala z:

Restrikční endonukleáza NotI	5 μ l
10x <i>Orange buffer</i>	1,5 μ l
DNA	7,5 μ g
ddH ₂ O	Doplnit do 15 μ l

- Reakci jsme inkubovali po dobu 60 minut v 37°C.
- Následně jsme provedli kontrolu kvality štěpní na agarózové elektroforéze (viz 4.2.3.11 Agarózová elektroforéza DNA).

4.2.4.3 *In vitro* transkripce

Metoda *in vitro* transkripce představuje způsob jak vytvořit velké množství molekul mRNA, které je následně možné transfekovat do cílových buněk. Nevýhodou této metody, oproti stabilním buněčným liniím, je potřeba buňky opakovaně transfekovat, jako v případě transientní transfekce.

4.2.4.3.1 Standardní *in vitro* transkripční reakce

Většina dostupných komerčních souprav je odvozena od transkripčního systému bakteriofágů, jako například *TranscriptAidTM T7 High Yield Transcription Kit* od *ThermoFisher ScientificTM* (viz 4.1.4 Komerční soupravy), který byl použit v této práci. Tato souprava využívá jako templát DNA s promotorem z bakteriofága T7 poskytnutý uživatelem, bakteriofágovu T7 RNA polymerázu a ribonukleotidy.

Při použití komerční soupravy *TranscriptAidTM T7 High Yield Transcription Kit* jsme pracovali podle protokolu přidaného k soupravě.

- Komponenty reakční směsi jsme přidali v tomto pořadí:

ddH ₂ O ošetřena DEPC	4 µl
5x <i>TranscriptionAid</i> reakční pufr	4 µl
Mix NTP (každý 100mM)	8 µl
Templátová DNA	0,5 - 1 µg
T7 <i>TranscriptionAid</i> Enzymový mix	2 µl

- Celkový objem reakční směsi činil 20 µl.
- Komponenty kontrolní reakční směsi jsme přidali v tomto pořadí:

ddH ₂ O ošetřená DEPC	4 µl
5x <i>TranscriptionAid</i> reakční pufr	4 µl
Mix NTP (každý 100mM)	8 µl
Kontrolní DNA (0,5 µg/µl)	2 µl
T7 <i>TranscriptionAid</i> Enzymový mix	2 µl

- Celkový objem kontrolní reakční směsi činil 20 µl.
- Reakční směs jsme zvortexovali a následně centrifugovali po dobu 30 vteřin/2000g.
- Reakční směs jsme inkubovali v 37°C po dobu 4 až 5 hodin.
- Po inkubační době jsme 5 µl reakční směsi zředili s ddH₂O ošetřenou DEPC v poměru 1:40.
- Část objemu vzorku jsme zředili 1:1 s 2x RNA *loading dye*.
- Směs zředěné reakční směsi a barvičky jsme nanесли na 1% agarózový gel (viz 4.2.4.1 Agarosová elektroforéza RNA).

4.2.4.3.2 *In vitro* transkripční reakce s analogem čepičky

Přidáním analogu čepičky do modifikované *in vitro* transkripční reakce, lze ve výsledku získat RNA molekuly, které budou mít inkorporovanou právě tuto molekulu

na 5' konci. Analog čepičky pak funguje jako 7-metylguanosenová čepička, kterou můžeme najít na 5' konci eukaryotických mRNA.

- Komponenty reakční směsi jsme přidali v tomto pořadí:

ddH ₂ O ošetřena DEPC	3,5 µl
5x <i>TranscriptionAid</i> reakční pufr	4 µl
ATP (100mM)	1,5 µl
CTP (100mM)	1,5 µl
UTP (100mM)	1,5 µl
GTP (30mM)	1 µl
Analog čepičky, m ⁷ GTP (100mM)	3 µl
Templátová DNA	0,5 - 1 µg
T7 <i>TranscriptionAid</i> Enzymový mix	2 µl

- Celkový objem reakční směsi činil 20 µl.
- Komponenty kontrolní reakční směsi jsme přidali v tomto pořadí:

ddH ₂ O ošetřena DEPC	3,5 µl
5x <i>TranscriptionAid</i> reakční pufr	4 µl
ATP (100mM)	1,5 µl
CTP (100mM)	1,5 µl
UTP (100mM)	1,5 µl
GTP (30mM)	1 µl
Analog čepičky, m ⁷ GTP (100mM)	3 µl
Kontrolní DNA (0,5 µg/µl)	2 µl
T7 <i>TranscriptionAid</i> Enzymový mix	2 µl

- Celkový objem kontrolní reakční směsi činil 20 µl.
- Zbytek postupu jako u klasické *in vitro* transkripce (viz 4.2.4.3.1 Stanardní *in vitro* transkripční reakce).

4.2.4.3.3 Degradace DNA ve vzorku *in vitro* transkripce

Degradace DNA ve vzorku po *in vitro* transkripci bylo dosaženo pomocí komerční soupravy *TURBO DNA-freeTM Kit* od společnosti *Ambion[®]* (viz 4.1.4 Komerční soupravy).

- Do reakční směsi z *in vitro* transkripční reakce bylo přidáno 0,1 objem 10x *TURBO DNase buffer* a 1 μ l *TURBO DNase I*.
- Vzorek byl krátce zvortexován a následně centrifugován po dobu 30 vteřin nebo dokud nezmizela peleta.
- Vzorek byl inkubován po dobu 20 – 30 minut v teplotě 37°C.
- Do vzorku byl přidán 0,1 objem *DNase inactivation reagent*, pro zastavení reakce.
- Vzorek byl ponechán po dobu 5 minut v pokojové teplotě a v průběhu inkubační doby byl každých 30 vteřin krátce vortexován.
- Vzorek byl centrifugován 90 vteřin / 10000g.
- Vodná fáze byla přenesena do mikrozkušavky.
- 5 μ l vzorku bylo zředěno ddH₂O ošetřenou DEPC v poměru 1:40.
- Část objemu vzorku byla zředěna 1:1 s 2X *RNA loading dye*.
- Vzorek byl inkubován po dobu 10 minut v teplotě 70°C.
- Směs zředěného vzorku a barvičky byla nanášena na 1% agarózový gel (viz 4.2.4.1 Agarosová elektroforéza RNA).

4.2.4.4 RT-qPCR

4.2.4.4.1 Reverzní transkripce

Vzorek RNA jsme izolovali z transfekované kultury za použití *TRI[®] reagent* roztoku. Při izolaci jsme postupovali podle protokolu výše zmíněné komerční soupravy.

- Z jamky s buněčnou kulturou jsme odebrali médium a promyli jsme jamku 50 μ l PBS, které jsme následně odsáli.
- Do jamky jsme přidali 500 μ l roztoku *TRI[®] reagent* a nechali jsme vzorek zlyzovat.

- Vzorek jsme nechali 5 minut v teplotě místnosti. Následně jsme přidali 100 μ l chloroformu. Vzorek jsme zvortexovali a následně inkubovali po dobu 15 minut v teplotě místnosti.
- Vzorek jsme centrifugovali 12000g/ 15 minut v teplotě 4°C.
- Vodní fázi jsme nové mikrozkuhavky a přidali jsme 250 μ l isopropanolu. Vzorek jsme nechali inkubovat 10 minut v teplotě místnosti.
- Vzorek jsme centrifugovali 12000g/10 minut v teplotě 4°C.
- Odsáli jsme supernatant a k peletě jsme přidali 500 μ l 75% etanolu. Vzorek jsme zvortexovali a následně centrifugovali 7500g/ 5minut v 4°C.
- Odsáli jsme supernatant a peletu jsme nechali sušit na vzduchu. Následně jsme peletu rozpustili v 30 μ l ddH₂O.

Reverzní transkripci molekul mRNA jsme uskutečnili za použití oligo(dT) primerů a reverzní transkriptázy M-MuLV Reverse Transcriptase. Nejdříve jsme připravili hybridizační směs, která obsahovala vodu, vzorek RNA a oligo(dT) primery.

RNA	3 μ g
Oligo(dT) primery (10 μ M)	4 μ l
ddH ₂ O	Doplnit do 16 μ l

Směs jsme inkubovali po dobu 10 minut v 65°C a 10 minut na ledu. Následně jsme připravili reverzně transkripční reakci:

dNTPs (10mM)	8 μ l
5x pufr M-MuLV reverzní transkriptázy	4 μ l
M-MuLV Reverse Transcriptase 20 U/ μ l	4 μ l
ddH ₂ O	32 μ l
Hybridizační směs	16 μ l

Reverzní transkripci jsme uskutečnili programem:

37°C	1 minuta
42°C	2 hodiny
72°C	15 minut
4°C	

Dalším krokem byla qPCR (viz 4.2.4.4.2 qPCR).

4.2.4.4.2 qPCR

Reakční směs pro qPCR:

ddH ₂ O	0,5 µl
Primery (1,5µM)	2 µl
cDNA	2,5 µl
2x Fast Start SYBER Green master (Roche®)	5 µl

Program měl následující průběh:

1. 95°C	5 minut
2. 95°C	15 sekund
3. 60°C	20 sekund
4. 72°C	30 vteřin
Zpět do kroku 2.	Opakování 45 cyklů
5. 90°C	10 sekund
6. 65°C	1 minuta
7. 97°C	1 minuta
8. 40°C	10 sekund

Jako standard jsme použili gen *Surf* (viz 4.1.9 Oligonukleotidové primery). Analýzu výsledků jsme uskutečnili v programech *Light Cycler*® 480 a statistickou analýzu jsme uskutečnili Liwakovou metodou.

4.2.5 Práce s proteiny

4.2.5.1 In vitro translace

Pro metodu *in vitro* translace jsme použili komerční soupravu *Wheat germ extract*TM (*Promega*TM) (viz 4.1.4 Komerční soupravy). Při práci jsme použili upravený protokol této soupravy. Reakční směs se skládala z:

<i>Wheat germ extract</i> TM	25 µl
1mM Mix aminokyselin bez metioninu	2 µl
1mM Mix aminokyselin bez leucinu	2 µl
1M KAc	7 µl
RNA pro translaci	10 µl
RNasin [®] Inhibitor RNáz	1 µl
ddH ₂ O	3 µl

- Reakční směs jsme inkubovali v 25°C po dobu 7 hodin.

4.2.5.2 Lýze buněk a příprava vzorku pro BCA a western blot

Odebíráním vzorků rozumíme lýzy buněk v jamce nebo misce pro jejich následné zpracování dalšími metodami. K procesu odebírání vzorků jsme používali 1x vzorkový pufr, který jsme připravovali z 4x vzorkového pufru před každým použitím. Vzorkový pufr neobsahuje sloučeniny, které nedovolují nebo komplikují průběh reakce při měření koncentrace proteinů metodou BCA (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA) (*pozn.:* 4x Vzorkový pufr obsahuje SDS (viz 4.1.2 Roztoky), které může znemožňovat reakci BCA soupravy pro měření koncentrace proteinů. Nicméně po zředění Vzorkového pufru na 1x koncentrovaný a samotné zředění vzorku před měřením koncentrace proteinů zajišťuje, že se výsledná koncentrace SDS v reakční směsi výše zmíněné soupravy vyskytuje v takových hodnotách, které jsou podle výrobce této soupravy pod maximální dovolenou hodnotou koncentrace SDS pro bezproblémový průběh reakce).

4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA

Pro měření koncentrace proteinů metodou BCA jsme použili komerční soupravu *Pierce*TM *BCA Protein Assay Kit* od společnosti *ThermoFischer Scientific*TM. Při této metodě jsme postupovali podle protokolu komerční soupravy.

- Měření koncentrace proteinů jednotlivých vzorků jsme uskutečňovali v třech technických replikátech. Stejně jsme přistupovali i k vzorkům standardů roztoků BSA.

- Standardy BSA byly připraveny podle protokolu komerční soupravy v rozsahu 0 až 100 µg/ml v desítkových rozestupech.
- Pracovní roztok směsi reakčních roztoků jsme připravili v poměru 50:1 pro roztok A: roztok B.
- Zesonikovaný vzorek jsme 100x zředili a přidali jsme 15 µl zředěného vzorku k 150 µl reakčního roztoku. Reakci jsme nechali proběhnout v 96 jamkové destičce s plochým dnem. Reakci jsme inkubovali přes noc v teplotě místnosti.
- Měření intenzit reakční směsi jsme uskutečnili na přístroji *SpectraMax 340 PC EastPort Microplate reader*.

Při metodě SDS-PAAGE elektroforéze jsme nanseli na jamku vzorek o koncentraci 25 µg/µl, pokud není uvedeno jinak. Před nanesením vzorků je nutné vzorky ošetřit sonikací (15x během 30 vteřin při 50% amplitudě, přístroj: QSONICA) a následným přidáním 0,1 objemu bromfenolové modři a 0,1 objemu β-merkaptoetanolu.

4.2.5.4 Gelová elektroforéza SDS-PAAGE

- Pro přípravu 12% separačního gelu jsme připravili roztok:

30% Akrylamid	6ml
ddH ₂ O	5,25 ml
4x Tris-HCl/SDS 8,8 pH	3,75 ml
TEMED	15 µl
10% APS	75 µl

- TEMED a APS jsme přidali až těsně před přidáním do aparatury (viz níže).
- Roztok jsme jemně promíchali a napipetovali do připravené aparatury Mini-Protean® (BIO-RAD) pro nalívání gelů SDS-PAAGE. Horní část roztoku jsme převrstvili převrstvovacím roztok (viz 4.1.2 Roztoky) a nechali ztuhnout po dobu 45 minut.
- Po inkubační době jsme odstranili převrstvovací roztok a připravili jsme si zaostřovací gel:

30% Akrylamid	650 μ l
ddH ₂ O	3,05 ml
5x Tris-HCl/SDS pH 6,8	1,25 ml
TEMED	7,5 μ l
10% APS	37,5 μ l

- TEMED a APS jsme přidali až těsně před přidáním do aparatury (viz níže).
- Roztok jsme jemně promíchali a napipetovali na ztuhlý separační gel.
- Na roztok v aparatuře jsme nasadili jamkový hřebínek.
- Gel jsme nechali tuhnout po dobu 20 minut.
- Po ztuhnutí jsme vytáhli hřebínek, jamky promyli puřem 1x SDS.
- Skla se ztuhlým gelem jsme vložili do elektroforetického zařízení Mini-Protean[®] (BIO-RAD). Upravené a změřené vzorky (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA) jsme nanесли do jamek.
- Elektroforetický přístoj jsme zapojili do elektrického pole o napětí 150 V po dobu 60 až 85 minut.

4.2.5.5 Western blot

- Gel po SDS-PAAGE elektrofréze jsme nechali inkubovat 45 minut v 1x blotovacím roztoku (viz 4.1.2 Roztoky).
- Připravili jsme si 6 kusů 3mm filtračního papíru o rozměrech gelu a nechali je inkubovat v 1x blotovacím roztoku.
- Připravili jsme si PVDF membránu pro *western blot* o rozměrech gelu (poréznost membrány 0,2 μ m Immuno-blot[®] (BIO-RAD)) a aktivovali jsme ji (aktivace: 2 sekundy v 100% metanolu, 1 minuta v ddH₂O, 15 minut v 1x blotovacím roztoku).
- V pořadí 3x filtrační papír, gel, aktovaná membrána, 3x filtrační papír, jsme přichystali složky do přístroje Owl HEP-1 (*ThermoFischerTM Scientific*).
- Přístroj jsme zapojili do elektrického pole o proudu 100mA na jednu membránu (na dvě membrány 200mA) po dobu 60 minut.

4.2.5.6 Imunodetekce

- Membránu, která prošla metodou *western blot*, jsme blokovali v blokovacím roztoku (viz 4.1.2 Roztoky) po dobu 1 hodiny.
- Následně jsme membránu zatačili do fólie s naředěnou primární protilátkou volby (viz 4.1.6 Protilátky).
- Nechali jsme zatavenou membránu inkubovat v 4°C přes noc.
- Následující den jsme membránu promyli 3x15 minut v odmyvacím roztoku (viz 4.1.2 Roztoky).
- Membránu jsme blokovali v blokovacím roztoku po dobu 1 hodiny.
- Následně jsme membránu zatačili do fólie s naředěnou sekundární protilátkou volby (viz 4.1.6 Protilátky).
- Nechali jsme zatavenou membránu inkubovat v 4°C po dobu 2 hodin.
- Po inkubaci jsme membránu promyli 3x15 minut v odmyvacím roztoku.
- Detekci sekundární protilátky jsme uskutečnili metodou chemiluminiscence za použití přístroje *ImageQuantTM LAS-4000 (GE healthcareTM)* následujícím způsobem.
- Připravili jsme dva roztoky: 4,5 ml ddH₂O + 0,5 ml 1M Tris-HCl pH 8,5. K jednomu roztoku jsme přidali 3 µl 30% roztoku H₂O₂. K druhému roztoku jsme přidali 50 µl luminolu a 22 µl kyseliny p-kumurové (viz 4.1.2 Roztoky).
- Roztoky jsme smíchali, propipetovali a přenesli jsme část na membránu určenou pro imunodetekci.
- Pomocí programu dodávaného k přístroji *ImageQuantTM LAS-4000 (GE healthcareTM)* jsme detekovali chemiluminiscenční reakci. Nastavení přístroje: *detection mode – precision, exposure time: 10 sekund, quality – standard, high.*
- Analýzu intenzit proužků jsme uskutečnili v programu ImageJ za použití obrázků kvality *standard*, 8-bit. Prenzetrované výsledky jsou v kvalitě *standard* nebo *high*.

4.2.5.7 Strippování membrán

Strippování membrán, neboli odstranění protilátek, je proces při kterém dojde k odstranění protilátek z membrány použité na imunodetekci. Následně je možno tuto membránu použít pro opětovnou imunodetekci s novými protilátkami.

- Strippovací roztok (5ml pH 6,8 Tri-HCl, 300 μ l β -merkaptoetanolu, 8 ml 10% SDS, 27 ml ddH₂O) byl přidán do vaničky s membránou určenou ke strippování.
- Vaničku s roztokem a membránou jsme inkubovali ve vodní lázni o teplotě 50°C po dobu 30 minut.
- Následně jsme membránu promývali 5x 20 minut v odmívacím roztoku.
- Po promývání se pokračuje metodou Imunodetekce (viz 4.2.5.6 Imunodetekce).

4.2.5.8 Duální luciferázový test

Ke stanovení aktivity HCV IRES, jsme použili metodu DLR (*Dual-reporter luciferase[®] assay system*). Jedná se o metodu běžně používanou pro studium HCV IRES (Gilbert 2010) Tato metoda je zavedená v naší laboratoři. Ze zmíněných důvodů jsme se rozhodli pro použití této metody i v této práci. Tato metoda je zprostředkována díky komerční soupravě *Dual-Luciferase[®] Reporter assay system (PromegaTM)*. Systém se skládá z více krokové reakce, která zajistí aktivitu první luciferázy (*Firefly luciferase*), její následnou inhibici a zároveň aktivaci druhé luciferázy (*Renilla luciferase*). Obě luciferázy jsou tak detekovatelné v oddělených krocích a je zajištěno, aby se signál první luciferázy nedetekoval při měření druhé luciferázy (viz 3.6 Metody studia IRES).

Měření aktivit luciferáz jsme provedli na přístroji *Variosken[®] Flash (Thermo ScientificTM)*. Příprava a měření se skládá z těchto kroků:

- Buňky byly lyzovány v 1x PLB (z ang. *Passive lysis buffer*).
- Vzorky jsme po minimální dobu 15 minut nechali na kývačce. Po inkubační době je možné pokračovat v proceduře nebo vzorky uskladnit v -70°C.
- K 100 μ l roztoku LARII (z ang. *Luciferase Assay Reagent II*) jsme přidali 20 μ l vzorku a měřili aktivitu *Firefly* luciferázy.
- Po měření jsme přidali 100 μ l roztoku *Stop&Glo* zředěného 1:50 s *Stop&Glo* puřem. Následně jsme měřili aktivitu *Renilla* luciferázy.

Analýzu naměřených hodnot jsme provedli v programu *Microsoft Excel*[®] a programu *R*.

Vzorky v 1x PLB se dají použít pro měření koncentrace proteinů metodou BCA (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA). Na základě naměřených dat koncentrace proteinů jsme normalizovali naměřené aktivity *Renilla* luciferázy a *Firefly* luciferázy. Po přidání redukčního činidla (0,1 objemu β -merkaptotanolu), ošetření vzorků a přidání barvičky (0,1 objemu bromfenolové modři) pro nanesení na SDS-PAAGE elektroforézu (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA) se dají vzorky použít i pro *western blot* (viz 4.2.5.5 *western blot*).

4.2.6 Statistická analýza dat

Statistická analýza dat byla uskutečněna v programu *R*. Tvorba grafů byla uskutečněna v programu *R* a *Microsoft Excel*[®].

Statistická analýza luciferázových aktivit při transientní transfekci: Data byla podrobena Shapiro testu pro zjištění normality dat. V případě normální distribuce následovala analýza rozptylu testem ANOVA. Při signifikantním nálezu v předchozím testu následoval Tukeyův HSD test. V případě nenormální distribuce (tj. neodpovídající Gaussovske distribuci) byl zvolen pro analýzu rozptylu Kruskal-Willisův test. Při signifikantním nálezu v předchozím testu následoval Dunnův test s Holmovou korekcí.

Statistická analýza poměrů *Firefly* luciferázy a *Renilla* luciferázy: Data byla podrobena Shapiro testu pro zjištění normality dat. V případě nenormální distribuce byl zvolen pro analýzu rozptylu Kruskal-Willisův test. U dat nebyl nalezen signifikantní výsledek.

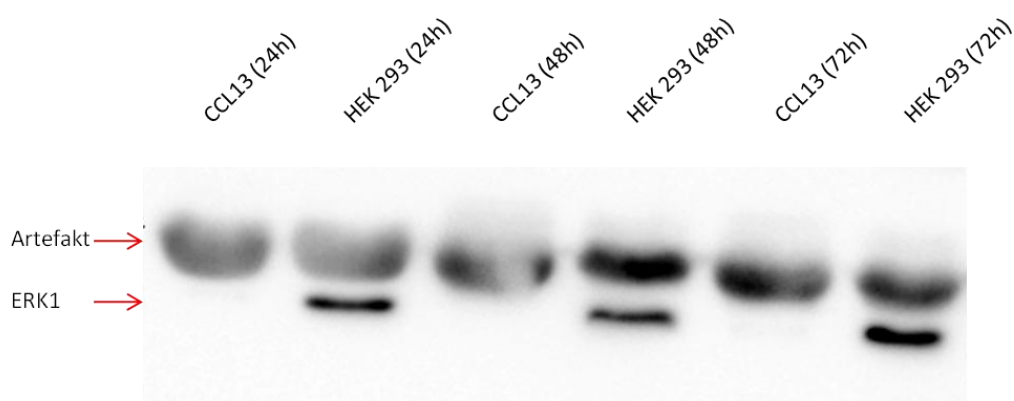
5 Výsledky

5.1 Buněčná linie pro zavedení metody RNA interference

Naším prvním úkolem, který jsme nutně museli splnit před jakýmkoliv dalším pracovním postupem, bylo zavedení metody RNA interference v naší laboratoři. Jak už bylo zmíněno, tato metoda nebyla v naší laboratoři doposud používána, proto byly jakékoliv postupy s tímto procesem spjatý naprosto pionýrské.

Pro zavedení této metody jsme potřebovali buněčnou linii, o které jednoznačně víme, že jsme schopni detekovat proteinkinázu ERK1 po *western blotu* metodou imunodetekce. Tato podmínka byla nezbytná proto, abychom mohli detekovat změny v hladině proteinu ERK1. V tento moment nás zajímala pouze proteinkináza ERK1, protože jsme měli primární protilátku rozpoznávající tento protein a siRNA cílící mRNA stejného proteinu (viz 4.1.7 siRNA). Podmínkou pro získání protilátky rozpoznávající ERK1 i ERK2 a siRNA na mRNA ERK1, respektive mRNA ERK2, bylo úspěšné zavedení metody RNA interference dosavadními prostředky (viz výše).

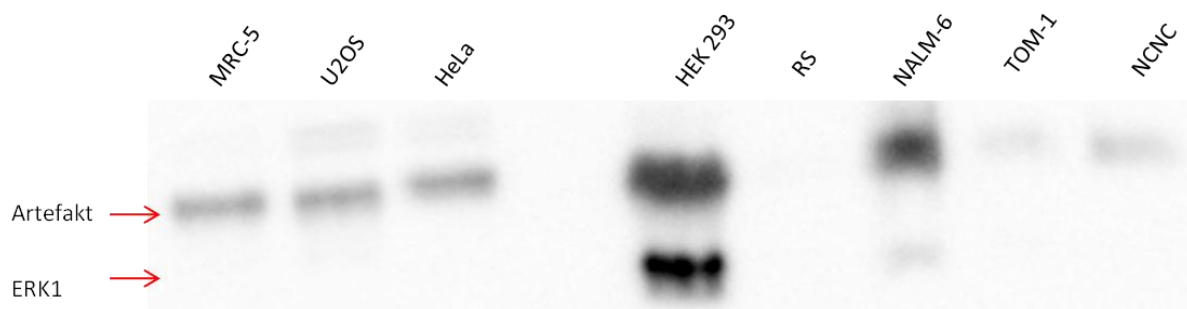
První pokusy imunodetekce ERK1 jsme uskutečnili na buněčné linii CCL13 a HEK 293 (viz 4.1.11 Buněčné linie). Vzorky jsme odebírali v čase, po 24, 48 a 72 hodinách nasazení buněk (viz Obrázek 9).



Obrázek 9: Imunodetekce proteinkinázy ERK1 v buněčných liniích CCL13 a HEK 293 v čase. Při používání primární protilátky (viz 4.1.6 Protilátky) pro imunodetekci proteinu ERK1 jsme kromě pruhu odpovídajícímu proteinu ERK1 byli schopni detekovat i pruh o vyšší molekulové hmotnosti. Tento pruh jsme označovali jako artefakt. Přestože toto označení nejspíš přesně neodpovídalo pozorovanému úkazu, rozhodli jsme se u něj zůstat i při psaní této práce, protože je jasné, výstižné a není spjato s jiným obsahem této práce. Po identitě artefaktu jsme v této práci nepátrali.

Dle výsledku prezentovaného na obrázku 9. jsme usoudili, že jsme schopni detekovat protein ERK1 ve vzorku z buněčné linie HEK 293. U buněčné linie CCL13 jsme nebyli schopni dosáhnout stejného výsledku, jako u buněčné linie HEK 293. Přestože nemůžeme s jistotou říct, co zapříčinilo takový výsledek (viz výše), rozhodli jsme se, že po příčině nebudeme pátrat.

Kromě vzorků, které jsme připravili pro výše zmíněný experiment, jsme dostali k dispozici vzorky kontrol různých buněčných linií z experimentů, které se prováděly v naší laboratoři v rámci jiného projektu. Jednalo se o buněčné linie: MRC-5, U2OS, HeLa, HEK 293, RS, NALM-6, TOM-1 a NCNC (buněčné linie, kromě HEK 293, nejsou uvedeny v materiálech, protože jsme s nimi nepracovali přímo). Tyto vzorky jsme použili pro imunodetekci proteinu ERK1 podobně jako v předchozím případě s buněčnými liniemi CCL13 a HEK 293 (viz 4.2.5.6 Imunodetekce, 4.1.6 Protilátky, viz Obrázek 10).



Obrázek 10: Imunodetekce proteinu ERK1 v různých buněčných liniích. Při používání primární protilátky (viz 4.1.6 Protilátky) pro imunodetekci proteinu ERK1 jsme kromě pruhu odpovídajícímu proteinu ERK1 byli schopni detekovat i pruh o vyšší molekulové hmotnosti. Tento pruh jsme označovali jako artefakt. Po identitě artefaktu jsme v této práci nepátrali.

Na základě výsledků experimentů prezentovaných v obrázcích XX a XX, jsme se rozhodli pro další experimenty pracovat s buněčnou linií HEK 293, ve které jsme byli schopni pomocí imunodetekce identifikovat ERK1. Tato linie je také permisivní pro HCV IRES (Kato *et al.* 2005).

5.2 Zavedení metody RNA interference pomocí siRNA

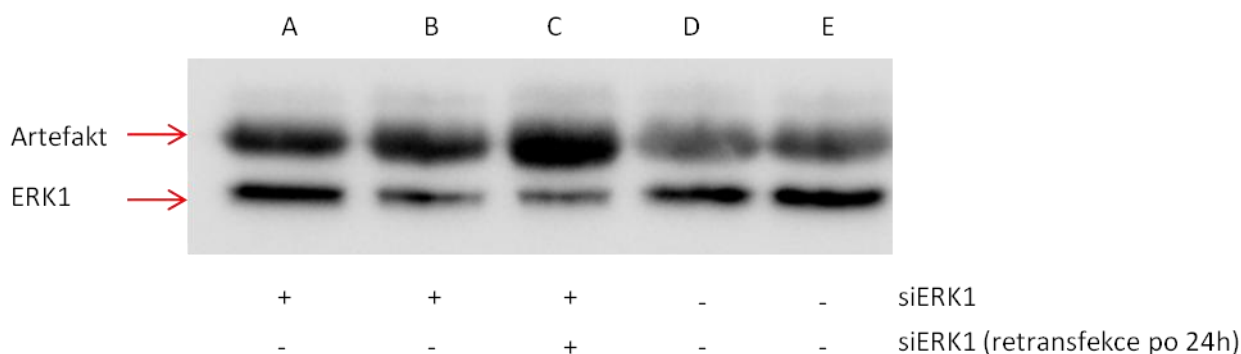
Poté co jsme vybrali vhodnou buněčnou linii, ve které jsme schopni detekovat proteinový produkt ERK1, mohli jsme přistoupit k samotné přípravě protokolu a optimalizaci metody RNA interference indukované pomocí siRNA.

Molekuly siRNA jsme si nechali připravit od firmy *Sigma-Aldrich*[®] podle sekvence publikované v práci Casanova *et al.* (viz 4.1.7 siRNA) (Casanova *et al.* 2012). siRNA o totožné sekvenci se prokázala jako efektivní ve výše zmíněné práci (viz Tabulka 1), což dokazují samotná data prezentovaná v doplňujících údajích samotného článku (z ang. *supplementary data*), ale i elektronická korespondence samotné první autorky tohoto článku s mým školitelem, kde tyto informace potvrzuje.

Gen	RefSeq	5'-3' sekvence <i>sense</i> siRNA	Normalizovaná aktivita luciferázy
MAPK3	NM_001040056	GGAUCAGCUCAACCACAUUtt	46
MAPK3	NM_001040056	GGACCGGAUGUUAACCUUtt	71
MAPK3	NM_001040056	GACCUGAAUUGUAUCAUCatt	160

Tabulka 1: *Sense* sekvence jednotlivých siRNA cílící mRNA proteinu ERK1, které byly použity ve studii Casanova *et al.* 2012. *Sense* sekvence siRNA v prvním řádku se sekvenčně shoduje se sekvencí *sense* siRNA, kterou jsme použili pro pilotní experimenty při zavedení metody siRNA v naší laboratoři. RefSeq je databázové označení určitého genu v databázi *NCBI*. Normalizovaná aktivita luciferázy označuje poměr aktivit *Firefly* luciferázy ve vzorku ošetřeném siRNA vůči hodnotě *Firefly* luciferázy v negativní kontrole ošetřené Scrambled siRNA, hodnoty vychází z výše zmíněné studie. Hodnota v zeleném poli normalizované aktivity luciferázy poukazuje na snížení její aktivity vůči dolní hranici stanovené meze definované ve výše zmíněné studii. Upraveno podle (Casanova *et al.* 2012).

S připravenou siRNA jsme přistoupili k prvnímu experimentu, kdy jsme transfekovali buněčnou linii HEK 293 molekulami siRNA (viz Obrázek 11). Jako transfekční činidlo jsme použili *RiboCellin* (*BioCellChallenge*TM) (viz 4.2.2.7 Transfekce buněčné linie molekulami siRNA).

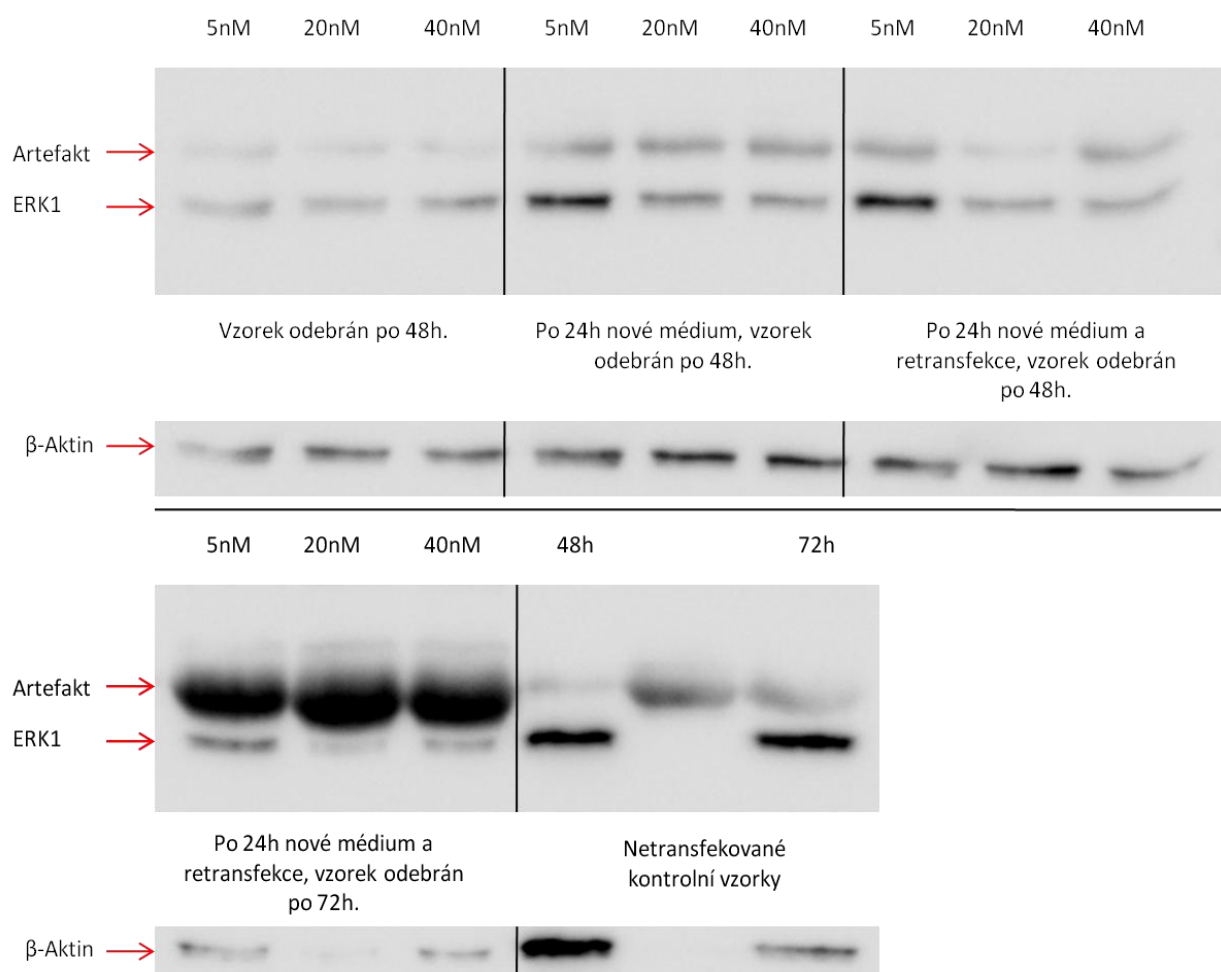


Obrázek 11: Imunodetekce proteinu ERK1 ve vzorcích transfekované buněčné linie HEK 293 pomocí 5nM siRNA cílící ERK1 (viz 4.1.7 siRNA). Jako transfekční činidlo jsme použili *RiboCellin* (*BioCellChallengeTM*) (viz 4.2.2.7 Transfekce buněčné linie molekulami siRNA). **A:** Vzorek ošetřený siERK1, vzorek odebrán po 48 hodinách. **B:** Vzorek ošetřený siERK1, po 24 hodinách jsme vyměnili médium a přidali čerstvé. Vzorek byl odebrán po 48 hodinách od transfekce. **C:** Vzorek ošetřený siERK1, po 24 hodinách byl vzorek opět ošetřen siERK1. Vzorek byl odebrán po 48 hodinách. **D:** Kontrolní vzorek, netransfekován. Vzorek odebrán po 48 hodinách. **E:** Kontrolní vzorek, netransfekován. Po 24 hodinách jsme vyměnili médium a přidali čerstvé. Vzorek byl odebrán po 48 hodinách. Analýzou intenzity pruhů jsme zjistili, že jsme pomocí siRNA snížili hladinu enzymu ERK1 o: 0% u vzorku A; 15% u vzorku B; 50% u vzorku C. Hodnoty jsou v případě vzorku A vztaženy k negativní kontrole, vzorku D. V případě vzorku B a C jsou hodnoty vztaženy k negativní kontrole, vzorku E. Analýza intenzity pruhů byla uskutečněna pomocí programu ImageJ.

Pomocí siRNA se nám podařilo snížit hladiny proteinu ERK1 o 15% u vzorku, kterému bylo po 24 hodinách od transfekce vyměněno médium, respektive 50% u vzorku, který byl po 24 hodinách od transfekce, transfekován znovu (viz Obrázek 11). Tyto hodnoty samozřejmě nebyly dostačující pro naše další experimentální postupy. Proto jsme se rozhodli v dalším experimentu použít i vyšší koncentrace siRNA. Vedle již zmíněných snížení hladin proteinu ERK1 jsme si všimli i nižší konfluency, kterou měly transfekované buněčné linie oproti netransfekovaným kontrolám.

Kromě již použité 5nM koncentrace siRNA, jsme v následujícím experimentu použili i 20nM a 40nM koncentraci. Uvědomujeme si, že takto vysoké koncentrace jsou daleko nad použitelnou hranicí, na které by se daly považovat experimentální výsledky za přijatelné (hraniční hladina použitelné siRNA pro experimenty je 10nM, i v takových koncentracích bude mít siRNA vedlejší efekt, avšak tato hodnota je obecně považována za přijatelnou) (Jackson *et al.* 2003, 2006). V našem případě šlo o detekci efektu, snížení hladiny proteinu ERK1. Potřebovali jsme vědět, že naše

siRNA funguje a toho bychom měli dosáhnout i za výše popsaných podmínek (viz Obrázek 12).



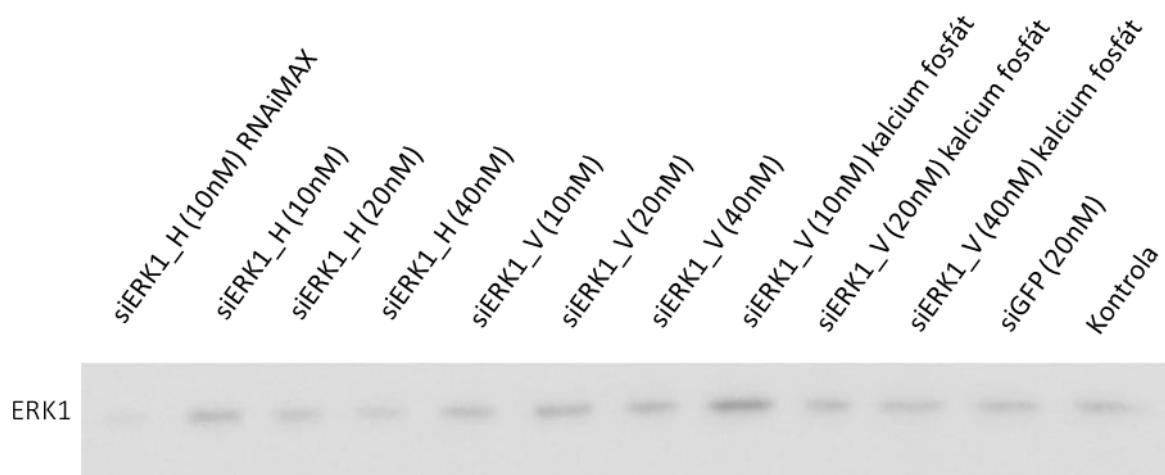
Obrázek 12: Imunodetekce proteinu ERK1 ve vzorcích transfekované buněčné linie HEK 293 molekulami siRNA cílící mRNA pro protein ERK1 (viz 4.1.7 siRNA). Hodnoty v nM označují koncentraci siRNA, která byla použita při transfekci buněčné linie pomocí transfekčního činidla *RiboCellin* (*BioCellChallengeTM*) (viz 4.2.2.7 Transfekce buněčné linie molekulami siRNA). Hodnoty intenzit pruhů odpovídající proteinu ERK1 byly normalizovány k hladině β-aktinu. U vzorků odebraných po 48 hodinách od transfekce jsme získali nejlepší výsledky z hlediska snížení hladiny proteinkinázy ERK1, pro 20nM koncentraci siRNA byla tato hodnota o 40% nižší než hodnota u kontrolního vzorku. U ostatních vzorků jsme dosáhli horších výsledků.

U vzorků, kdy jsme po 24 hodinách od transfekce vyměnili médium a celkově jsme je odebrali po 72 hodinách inkubace, jsme pozorovali, že dochází k odlučování kusů biomasy od dna jamky. Během dne se počet buněk nepřisedlých ke dnu jamky zvyšoval. Doposud jsme v žádném případě podobný jev neviděli. Nejdříve jsme

pozorovaný jev přičítali dlouhé inkubaci buněk v 24 jamkové destičce a jejich vysoké konfluenci. Nicméně nemůžeme vyloučit ani jiné varianty (viz níže).

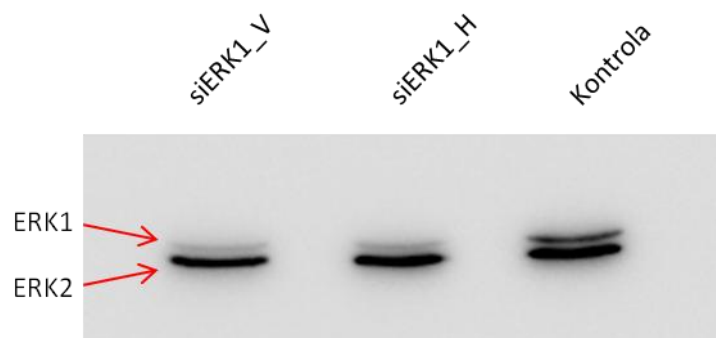
Se zavedením metody RNA interference pomocí siRNA jsme měli ze začátku problémy (viz výše). Proto jsme se rozhodli požádat o pomoc dr. Vomastka, který má bohaté zkušenosti s prací na proteinkinázách ERK1 a ERK2, včetně úspěšných siRNA experimentů. Dr. Vomastek nám poskytl cenné rady a vzorky siRNA proti lidským a myším mRNA proteinů ERK1, respektive ERK2, které jsou používány v jeho laboratoři a laboratoři dr. Hodného, spolu s protilátkami rozpoznávající protein ERK1, oba proteiny ERK1 i ERK2 a protilátku, která rozpoznává pouze ERK2. (viz 4.1.6 Protilátky).

V následujícím experimentu jsme se rozhodli otestovat siRNA rozpoznávající mRNA pro ERK1, které jsme obdrželi od dr. Vomastka a dr. Hodného. Jako transfekční činidlo jsme použili *RiboCellin* (*BioCellChallenge*TM). Dále jsme použili siRNA od dr. Vomastka, stejnou jako v předchozím případě, k transfekci jsme použili metodu kalcium fosfátovou transfekci. Dále jsme použili siRNA od dr. Hodného, avšak jako transfekční činidlo jsme použili *Lipofectamin*[®] *RNAiMAX Reagent* (*Invitrogen*TM), které jsme do této doby netestovali. Jako negativní kontrolu jsme použili 20nM siRNA rozpoznávající mRNA proteinu GFP, protože jsme v této době ještě neměli lepší negativní kontrolu (viz Obrázek 13).



Obrázek 13: Imunodetekce proteinkináz ERK1, za použití protilátky ERK 1 Antibody (K-23) (viz materiály). Hodnoty v závorkách označují koncentraci siRNA použitou pro transfekci buněčné linie HEK 293. siERK1_H: siRNA obdržená od dr. Hodného, siERK1_V: siRNA obdržená od dr. Vomastka. siGFP: siRNA rozpoznávající mRNA pro protein GFP (viz materiály). RNAiMAX, kalcium fosfát: použité transfekční činidlo (viz materiály). Pokud není u vzorku napsáno použité transfekční činidlo, použili jsme RiboCellin (BioCellChallenge™). Kontrola označuje netransfekovaný vzorek. Koncentrace proteinů nanesených na SDS-PAAGE elektroforézu činila 10 µg/µl. U vzorku siERK1_H (10nM) RNAiMAX se nám podařilo snížit hladinu proteinu ERK1 o 82%, toto byl zároveň nejlepší z výsledků.

Na základě výše prezentovaného experimentu (viz Obrázek 13) jsme dospěli k názoru, že nejlepšího efektu siRNA jsme schopni dosáhnout při použití transfekčního činidla *Lipofectamin® RNAiMAX Reagent (Invitrogen™)*. Efekt by mohl být ještě účinnější, po imunodetekci a kontrole protokolu jsme našli chybu při použití nového transfekčního činidla, výsledná koncentrace použitá pro transfekci buněčné linie molekulami siRNA byla ve skutečnosti o řád nižší, než jsme se domnívali a tedy než je zobrazeno v Obrázku 12 a 13. I z těchto důvodů jsme se rozhodli experiment s transfekčním činidlem *Lipofectamin® RNAiMAX Reagent (Invitrogen™)* zopakovat (viz Obrázek 14).



Obrázek 14: Imunodetekce proteinkináz ERK1 za použití protilátky p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) Mouse mAb (viz materiály). V tomto experimentu se nám podařilo umlčet proteinkinázy ERK1 o 70% v případě siERK1_H, a o 75% v případě siERK1_V oproti kontrole. Kontrola je označení negativní kontroly, tedy netransfekovaný vzorek.

Výsledky prezentované výše pro nás znamenaly důležitý krok vpřed. Pořídili jsme siRNA cílicí mRNA proteinu ERK1 a siRNA cílicí mRNA proteinu ERK2, od společnosti Ambion® (viz 4.1.7 siRNA). Dále jsme pořídili negativní kontrolu ve formě Scrambled siRNA, od společnosti Ambion® (viz 4.1.7 siRNA) a protilátku vázající proteinkinázu ERK1 a ERK2 (p44/42 MAPK (Erk1/2) (3A7) Mouse mAb (viz 4.1.6 Protilátky).

5.2.1 miRNA-like efekt

Souběžně s experimenty v předchozí kapitole, jsme se rozhodli pro hlubší analýzu jevů, které jsme pozorovali v experimentech s původní siRNA, siERK1 (viz 4.1.7 siRNA), kterou jsme připravili podle sekvence siRNA použité v práci Casanova *et al.* 2012.

Fenotyp, který jsme byli schopni pozorovat (buňky odlupující se od dna jamky, viz 5.2 Zavádění metody RNA interference pomocí siRNA), a nízká efektivita siRNA (siERK1) v experimentech (viz Obrázek 12, 13), nás přivedly k myšlence, jestli by se výše zmíněná siRNA kromě částečného umlčení exprese genu pro protein ERK1, mohla podobným způsobem projevovat i na proteinkináze ERK2. Poté, co jsme v literatuře ověřili, zda je takový projev možný (Doench 2003; Ellwanger *et al.* 2011),

jsme přistoupili k základním bioinformatickým postupům, sekvenčnímu porovnávání kódujících sekvencí mRNA pro proteiny ERK1 a ERK2 a nepřekládaných oblastí.

Naše teorie byla následující: pokud by sekvence *sense* vlákna siRNA odpovídala z určité části mRNA homologního genu, mohla by se tato siRNA projevit na mRNA homologního genu jako miRNA. Tento projev se označuje jako *miRNA-like* efekt (z ang. *miRNA-like effect*, v této práci jsem si dovolil ponechat částečně anglické označení tohoto fenoménu, protože jsem shledal překlady do českého jazyka jako krkolomné a nepěkné).

Onou výše zmíněnou určitou částí sekvence *sense* vlákna siRNA je myšlena komplementární sekvence k *seed* regionu *antisense* vlákna siRNA. *Seed* region je klíčová oblast sekvence miRNA, která je buď v plném rozsahu nebo z její velké části nezbytná pro projev miRNA tak jak jí známe z živých organismů (Eiring *et al.* 2010).

Seed region siERK1, kterou jsme si nechali připravit podle sekvence v publikaci Casanova *et al.*, měl tuto sekvenci: 5'-AUGUGG-3', komplementární sekvence k výše zmíněnému regionu měla tuto primární strukturu: 5'-CCACAT-3'. Nejprve jsme pomocí sekvenčního porovnávání hledali celou sekvenci *sense* vlákna siERK1 a následně pouze komplementární sekvenci k *seed* regionu na *sense* vláknu siERK1.

Výše zmíněnou analýzou jsme objevili jedno místo potenciální vazby v kódující oblasti mRNA pro protein ERK2, dalších šest míst jsme objevili v 3' nepřekládané oblasti stejné mRNA (viz Obrázek 15).

A

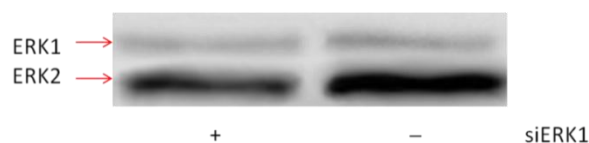
```
MAPK1_ccds 661 ATGCTTTCTAACAGGCCCATCTTTCCAGGGAAGCATTATCTTGACACAGCTGAACCACATT
siERK1      1 -----GGATCAGCTCAACCACATT
```

B

```
MAPK1_3_UTR 3001 ACATGTAGCTCACCAGTGGTTTTCTCTAAGGAATCACAAAAGTAACTACCCAAACACAT
siERK1      1 -----CCACAT
```

Obrázek 15: Příklad sekvenčního porovnání *sense* vlákna siERK1 a mRNA pro protein ERK2. **A:** Sekvenční porovnání siERK1 s kódující sekvencí pro protein ERK2 (CCDS13795, GRCh38). **B:** Sekvenční porovnání sekvence *sense* vlákna siERK1 komplementární k *seed* regionu na antisense vláknu siERK1 s 3' nepřekládanou oblastí mRNA pro protein ERK2 (ENST00000215832.10, ENST00000398822.7, GRCh38) V obou případech je červeně označena sekvence komplementární k *seed* regionu na antisense vláknu siERK1. Sekvenční porovnání bylo vytvořeno programem *Clustal Omega* verze 1.2.2, vizualizace byla vytvořena programem *BoxShade*.

Na základě výše zmíněné analýzy jsme se rozhodli pro experimentální postup, kterým bychom se pokusili objasnit, zda je popsáný jev opravdu příčinou výsledků, které jsme pozorovali v našem případě. Za použití primární protilátky detekující ERK1 i ERK2 (viz 4.1.6 Protilátky) jsme se rozhodli detekovat hladiny zmíněných proteinů metodou imunodetekce, ve vzorku buněk ošetřených siERK1 (viz Obrázek 16). Právě tou siRNA, se kterou jsme měli nejasné výsledky (viz 5.2 Zavedení metody RNA interference pomocí siRNA). V tento moment jsme i díky bioinformatické analýze (viz výše) měli oprávněné podezření na miRNA-like efekt, který by siERK1 mohla způsobovat. Vedle tohoto postupu, jsme navrhli primery umožňující detekci mRNA proteinu ERK1 a mRNA proteinu ERK2 metodou qRT-PCR (viz 4.2.4.4 RT-qPCR , viz Tabulka 2).

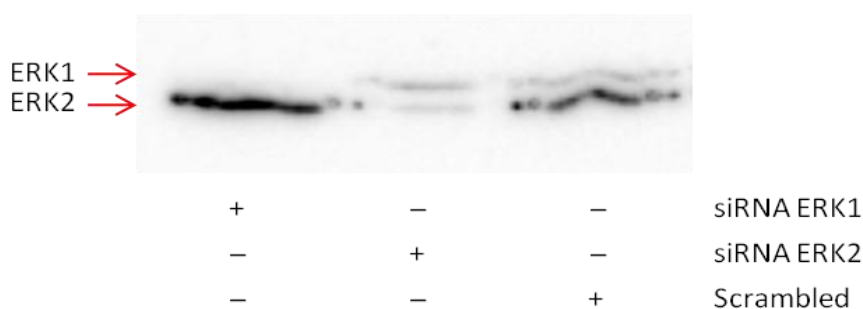


Obrázek 16: Imunodetekce proteinkináz ERK1 a ERK2 u vzorků ošetřených siERK1 (viz 4.1.7 siRNA) respektive netransfekované kontroly. U vzorku ošetřeného siERK1 jsme docílili snížení hladiny proteinu ERK1 o 19% a ERK2 o 33%, hodnoty jsou vztažené k netransfekované negativní kontrole.

siERK1 s miRNA-like efektem	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	% Redukce
mRNA ERK1	4,023	0,061	93,90%
mRNA ERK2	4,66	0,04	96%
siRNA ERK1	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	% Redukce
mRNA ERK1	7,04	0,006	99,40%
mRNA ERK2	-1,01	2,01	Zvýšení o 201%
siRNA ERK2	$\Delta\Delta Ct$	$2^{(-\Delta\Delta Ct)}$	% Redukce
mRNA ERK1	0,923	0,85	15%
mRNA ERK2	2,833	0,036	96,40%

Tabulka 2: Analýza dat qRT-PCR ze vzorků ošetřených siERK1, siRNA rozpoznávající ERK1 a siRNA rozpoznávající ERK2. siERK1 na základě prezentovaných výsledků qPCR redukuje hladinu mRNA pro protein ERK1, ale i mRNA proteinu ERK2, což se projevuje na hladině proteinu ERK2 (viz Obrázek 16). U vzorku ošetřeného siRNA rozpoznávající mRNA pro protein ERK1 (viz 4.1.7 siRNA), je pozorovatelné navýšení v hladině mRNA pro protein ERK2, což koreluje s navýšením hladina proteinu ERK2 (viz Obrázek 17). Analýza dat qPCR experimentů byla vyhodnocena Livakovou metodou.

Po analýze výsledků zmíněných výše, jsme zakoupili siRNA od firmy *Ambion*[®], totožnou s tou, které jsme jako zkušební vzorek obdrželi od dr. Hodného. Provedli jsme zkušební experiment, kde jsme pomocí těchto siRNA (viz 4.1.7 siRNA) indukovali snížení hladiny proteinu ERK1, respektive ERK2. Tento výsledek prezentujeme jako úspěšné zavedení metody RNA interference a splnění prerekvizity pro pokračování v náplni této práci (viz Obrázek 17).



Obrázek 17: Imunodetekce proteinkináz ERK1 a ERK2 u vzorků ošetřených siRNA ERK1, respektive siRNA ERK2 a negativní kontrola ošetřená Scrambled siRNA. Buněčná linie HEK 293 byla transfekovaná 5nM siRNA, vzorky byly odebrány po 48 hodinách. Při použití siRNA ERK1, byla hladina proteinu ERK1 snížena o 100%, hladina proteinu ERK2 ve stejném vzorku se zvýšila o 57%. Při použití siRNA ERK2, byla hladina proteinu ERK2 snížena o 93%, hladina proteinu ERK1 byla snížena o 15%. Hodnoty hladin proteinů jsou vztaženy k Scrambled negativní kontrole. Analýzu intenzity pruhů jsme uskutečnili pomocí programu ImageJ.

5.3 Příprava stabilních buněčných linií

Dalším z hlavních cílů této práce bylo připravit reportérový systém, který by sloužil jako model pro studium vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace nezávislé na čepičce, pomocí umlčení exprese genů pro ERK1, respektive ERK2 pomocí metody RNA interference zprostředkované siRNA. Jednalo se tedy o buněčný systém, přičemž první volbou pro nás byla příprava stabilních buněčných linií exprimující bicistronní reportérovou kazetu.

Pro tvorbu stabilních linií jsme použili soupravu *Flp-InTM System* a *Flp-InTM T-RExTM* (obojí od společnosti *InvitrogenTM*), která již byla použita v několika experimentech v naší laboratoři (viz 4.1.4 Komerční soupravy, 4.2.2.8 Příprava stabilně transfekovaných buněčných linií).

První pokus přípravy stabilních linií nesoucí bicistronní reportérovou kazetu byl neúspěšný. Po třech týdnech kultivace transfekovaných buněk jsme nebyli schopni pozorovat jedinou kolonii, která by znamenala úspěšnou integraci vektoru pcDNATM/FRT/TO/RiresL. Vzhledem k časové náročnosti tohoto experimentu jsme se rozhodli pokus jednou zopakovat, avšak se stejným výsledkem jako v prvním případě. Stejných výsledků jsme dosáhli i s použitím vektoru s kontrolní kazetou pcDNATM/FRT/TO/RL. I proto jsme se rozhodli přistoupit k další možnosti reportérového systému, který by zahrnoval přípravu molekul RNA z bicistronních kazet metodou *in vitro* transkripce a jejich následnou transfekcí do buněk.

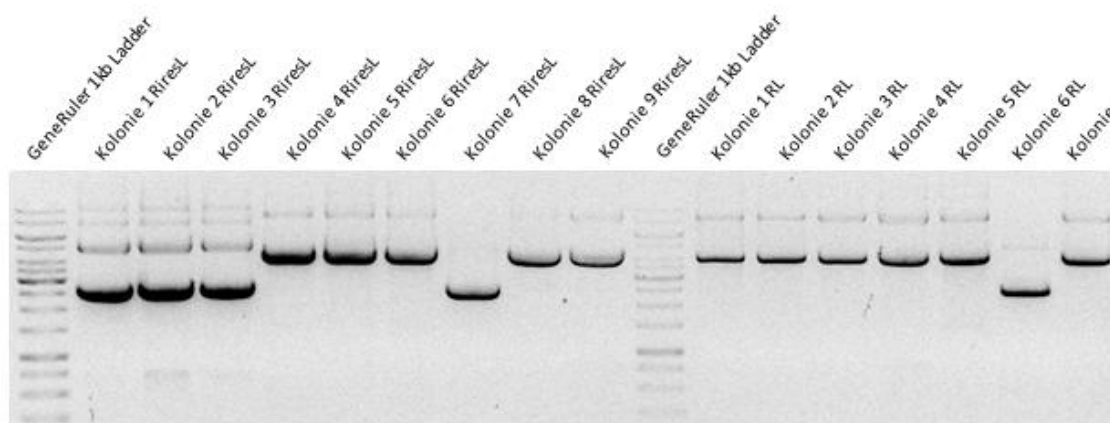
5.4 Příprava reportérového systému, *in vitro* transkripce

5.4.1 Příprava templátu pro *in vitro* transkripci

Jako další alternativu pro přípravu reportérového systému jsme vybrali metodu *in vitro* transkripce s následnou transfekcí reportérové RNA do buněčné linie HEK 293. Pro přípravu kazety vhodné pro *in vitro* transkripci pomocí soupravy *TranscriptAidTM T7 High Yield Transcription Kit*, bylo potřeba modifikovat bicistronní reportérovou kazetu začleněním T7 promotoru nezbytným pro průběh *in vitro* transkripční reakce (viz 4.2.4.3 *In vitro* transkripce). Připravili jsme upravenou bicistronní reportérovou kazetu pomocí PCR, přičemž 5'koncový primer obsahoval T7 promotorovou sekvenci (viz 4.2.3.6 PCR). V této reakci jsme použili primery

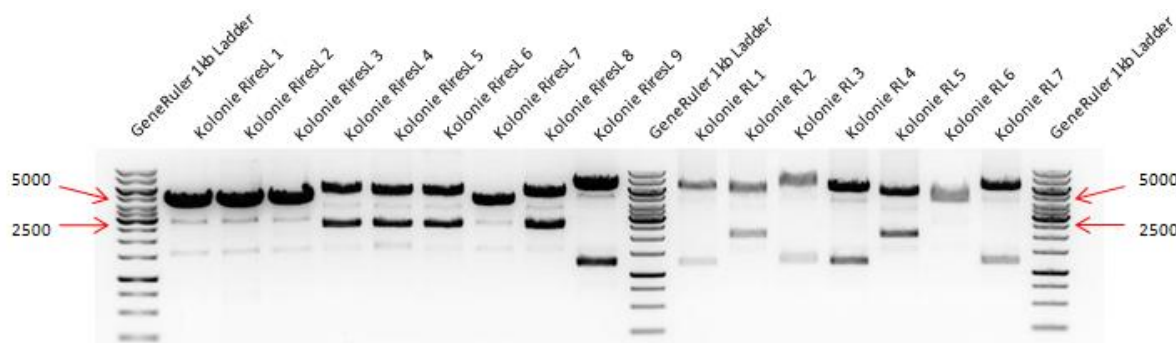
T7_RLuc_fwd_2 a T7_FLuc_rev (viz 4.1.9 Oligonukleotidové primery). Produkt PCR po purifikaci (viz 4.2.3.4 Přečištění DNA) sloužil jako templát pro *in vitro* transkripci. Stejné postupy jsme aplikovali i pro kontrolní reportérovou kazetu, která neobsahovala HCV IRES.

Nejprve jsme měli s přípravou upravené bicistronní i kontrolní reportérové kazety problémy. Po několika neúspěšných pokusech se nám podařilo připravit PCR produkt jak pro bicistronní reportérovou kazetu, tak pro kontrolní reportérovou kazetu (viz 4.2.3.6 PCR). Vzhledem k obtížím, které jsme při přípravě PCR produktů měli, jsme se rozhodli tyto amplikony naklonovat do vektoru z komerční soupravy *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit* (viz 4.1.4 Komerční soupravy, 4.2.3.7 Úprava konců amplikonů před klonováním DNA pomocí komerční soupravy *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*, Klonování pomocí komerční soupravy *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*). Dle protokolu výše zmíněné komerční soupravy jsme výslednou reakcí transformovali bakterie *E.coli* XL-1 *Blue* (viz 4.1.10 Bakteriální kmeny, 4.2.1.1 Transformace buněk *E.coli* metodou elektroporace). Transformované bakterie jsme vyseli na medium 2xTY s kanamycinem. Po inkubaci jsme vybrali několik monoklonií a izolovali jsme vektory (viz 4.2.3.1 Izolace vektorů z bakteriálních kultur pomocí komerční soupravy *Plasmid extraction Mini KitTM (FavorPrepTM)*) (viz Obrázek 18).



Obrázek 18: Elektroforetogram vzorků po izolaci vektorů z bakteriálních kultur *E.coli* XL-1 *Blue*. Buňky byly transformovány metodou elektroporace. Směs použitá k transformaci bakteriálních buněk byla výslednou reakční směsí klonování pomocí komerční soupravy *TOPO[®] TA Cloning[®] Kit*. Označení Kolonie RiresL označuje monokolonii transformovanou předpokládaným vektorem s naklonovanou bicistronní reportérovou kazetou. Kolonie RL označuje monokolonii transformovanou předpokládaným vektorem s kontrolní reportérovou kazetou bez HCV IRES. Číslovka v obou případech slouží k rozlišení různých monoklonií. **GeneRuler 1kb Ladder:** Standard molekulových hmotností.

Restrikční analýzou jsme zjistili, které vybrané monokolonie obsahují vektor s naklonovanou bicistronní reportérovou kazetu (respektive kontrolní kazetu) a jakou orientaci tato kazeta zaujímá. Vzhledem k charakteru reakce zprostředkované použitou komerční soupravou *TOPO® TA Cloning® Kit*, nelze zajistit, aby byly fragmenty, které chceme do vektoru pCR4-TOPO naklonovat vždy ve stejné orientaci. Proto jsme pro výše zmíněnou restrikční analýzu vybrali štěpení restrikční endonukleázou *Xma*II a *Eco*105I (viz 4.2.3.10 Dvojitě štěpení DNA restrikčními endonukleázami). Takto koncipovaná reakce nám dovolila zjistit, v jaké orientaci se reportérová kazeta nachází. Abychom mohli směřovat *in vitro* transkripci požadovaným směrem, bylo nutné vybrat takové vektory, které mají reportérovou kazetu naklonovanou tzv. ve směru požadové *in vitro* transkripce, tzn. tak, aby se kódující sekvence nacházeli na (+) vlákně. Restrikční reakce katalyzovaná enzymy *Xma*II a *Eco*105I na vyzírovaných vektorech (viz výše) rozdělila cirkulární vektor s bicistronní reportérovou kazetou na dva lineární fragmenty o délce 4732 bp a 2358 bp (u kontrolní reportérové kazety se jednalo o délky 4731 bp a 1974 bp), v případě naklonování reportérové kazety ve směru. (V opačném případě činily délky lineárních fragmentů, 5895 a 1195 pro vektor s reportérovou kazetou, respektive 5512 a 1193 pro vektor s kontrolní reportérovou kazetou). Takto získané vektory nesly označení TOPO_RiresL a TOPO_RL (viz Obrázek 19, viz 4.1.8 Vektory).



Obrázek 19: Elektroforetogram vzorků po izolaci vektorů z bakteriálních kultur *E.coli* XL-1 *Blue* po restrikční reakci katalyzované enzymy *Xma*II a *Eco*105I. Cirkulární vektory byly výše zmíněnými restrikčními endonukleázami rozděleny na dva lineární fragmenty. V případě, že byla reportérová kazeta naklonována ve směru, vznikly po restrikční reakci dva lineární fragmenty o délce 4732 bp a 2358 bp (respektive 4731 bp a 1974 bp u kontrolní reportérové kazety). Z této analýzy jsme vybrali vzorky označené Kolonie RiresL 8 a Kolonie RL 5, jakožto vzorky naklonované v orientaci podle našich požadavků. Červené šipky označují proužky odpovídající molekulové hmotnosti o určité délce párů bází. **GeneRuler 1kb Ladder:** Standard molekulových hmotností.

5.4.2 Sekvenování reportérových kazet a příprava zásobních vzorků

Na základě restriční analýzy (viz výše) jsme vybrali vzorky s označením Kolonie RireL 8 a Kolonie RL 5. V zájmu zjištění integrity reportérových kazet, bicistronní reportérové kazety s HCV IRES a kontrolní reportérové kazety bez tohoto elementu, jsme nechali obě výše zmíněné kazety u vybraných vzorků částečně osekvenovat v Laboratoři sekvenace DNA. Vzhledem k počtu párů bází, které tvoří obě kazety a GC smyčce, která může být problém pro DNA polymerázu použitou při sekvenační reakci, jsme se rozhodli pro variantu sekvenování s různými sekvenačními primery v oddělených reakcích. Výslednými daty bychom pak pokryli většinu sekvence obou reportérových kazet. Připravili jsme sekvenační směs podle instrukcí, které poskytla výše zmíněná laboratoř (viz 4.2.3.12 Sekvenace DNA) reakci jako takovou provedlo samo pracoviště. Analýzu sekvenčních dat, získaných ze sekvenční reakce, jsme uskutečnili programy *Chromas 2.6* (*TechnelysiumTM*) a *BenchlingTM* (viz Obrázek 20).

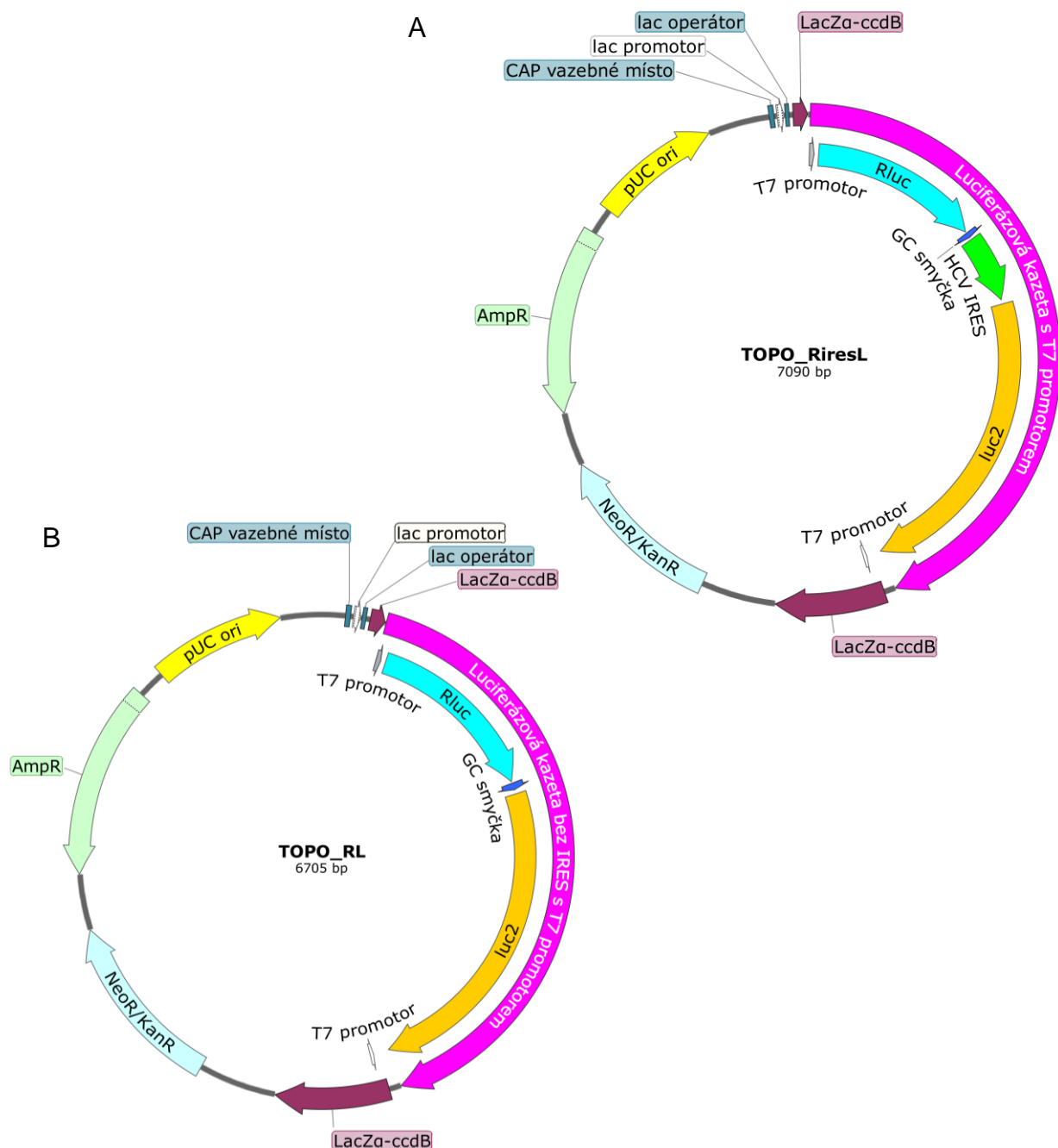
Úseky bicistronní reportérové kazety a kontrolní reportérové kazety, které jsme se rozhodli podrobit sekvenaci, se nacházeli na 5' koncové části a 3' koncové části kazet. Vedle těchto úseků nás zajímala i sekvence elementu HCV IRES. Sekvenace HCV IRES proběhla bez problému (viz Obrázek 20). S 5'koncovou a 3'koncovou oblastí obou kazet jsme měli problémy. V některých případech nebyl detekován dostatečně silný signál, v jiných případech byla zjištěná sekvence natolik krátká, že neposkytla informaci, z které by se dalo usuzovat cokoliv o kvalitě sekvence. I tyto problémy nás vedli k alternativní cestě jak zjistit, zda jsou geny v reportérových kazetách schopny kódovat funkční proteiny (viz 5.4.4 Test funkčnosti luciferáz).

IRES_RiresL	1	-----GCCAGCCCCCTGATGGG
Fluc2seqrev_seq	1	CCCCCCCCCCCCAAAGGGGGGGGGGGGAGGGCCAGGATCCGCCAGCCCCCTGAATGG
IRES_RiresL	18	GGCGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCG
Fluc2seqrev_seq	61	GCGGACACTCCACCATGAATCACTCCCCTGTGAGGAACTACTGTCTTCACGCAGAAAGCG
IRES_RiresL	78	TCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGTCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAG
Fluc2seqrev_seq	121	TCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTGTCGTCAGCCTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAG
IRES_RiresL	138	CCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTC
Fluc2seqrev_seq	181	CCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTGAGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCCTTTC
IRES_RiresL	198	TTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGA
Fluc2seqrev_seq	241	TTGGATAAACCCGCTCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGA
IRES_RiresL	258	GTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGAGTCCCC
Fluc2seqrev_seq	301	GTAGTGTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGCTTGCAGAGTCCCC
IRES_RiresL	318	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAA-----
Fluc2seqrev_seq	361	GGGAGGTCTCGTAGACCGTGCACCATGAGCACGAATCCTAAACCTCAAAGAAAAACCAA
IRES_RiresL		-----
Fluc2seqrev_seq	421	CGTAACACGAATTCAAAAATGGAAGATGCCAAAAACATTAAGAAGGGCCAGCGCCATTC
IRES_RiresL		-----
Fluc2seqrev_seq	481	TACCCACTCGAAGACGGGACCGCGGCGAGCAGCTGCACAAAGCCATGAAGCG

Obrázek 20: Sekvenční srovnání nukleotidové sekvence HCV IRES vektoru TOPO_RiresL (IRES_RiresL) a nukleotidové sekvence ze sekvenační analýzy (Fluc2seqrev_seq, viz výše). Data získaná ze sekvenační reakce pokrývají celou sekvenci HCV IRES a částečně i úseky kolem tohoto elementu. Sekvenační data odhalila dvě dvou nukleotidové mutace v rámci první vlásenky v sekvenci HCV IRES. Vzhledem k charakteru regionu, ve kterém se mutace nacházejí (viz 3.5. Iniciace translace zprostředkovaná HCV IRES) jsme se rozhodli tyto mutace nenapravovat, jelikož jsme usoudili, že by nemuseli mít vliv na další výsledky týkající se iniciace translace závislé na HCV IRES. Sekvenční srovnání a analýza sekvenčních dat byla provedena programy *T-Coffee*TM a *Benchling*TM (Notredame *et al.* 2000; Tommaso *et al.* 2011).

Vybrané kolonie bakterií s označením Kolonie RiresL 8 (pro bicistronní reportérovou kazetu) a Kolonie RL 5 (pro kontrolní reportérovou kazetu) jsme nechali pomnožit v tekutém médiu a následně jsme izolovali výše zmíněné vektory. Takto získané vzorky vektorů TOPO_RiresL a TOPO_RL sloužily jako zásobní zdroje pro *in vitro* transkripci (4.2.3.1 Izolace vektorů z bakteriálních kultur pomocí komerční soupravy *Plasmid extraction Mini Kit*TM (*FavorPrep*TM). Pro *in vitro* transkripci jsme pak použili jako templát lineární formu výše zmíněných vektorů. Linearizaci vektorů TOPO_RiresL a TOPO_RL jsme uskutečnili restrikční reakcí za použití enzymu *NotI*

(viz 4.2.4.2 Linearizace vektorů pro *in vitro* transkripci, viz Obrázek 22). Po každé reakci zprostředkované enzymem *NotI* jsme výsledný produkt zkontrolovali na elektroforetogramu (viz Obrázek 23). Restrikční endonukleáza *NotI* byla vybrána proto, aby druhý T7 promotor, který se na vektoru pCR4-TOPO (viz Obrázek 21) z komerční soupravy vyskytuje, nemohl iniciovat transkripci během *in vitro* transkripčního experimentu. Délka RNA produktů *in vitro* transkripce vektorů TOPO_RiresL a TOPO_RL, linearizovaných restrikční endonukleázou *NotI*, činila 3175, respektive 2743 nukleotidů.



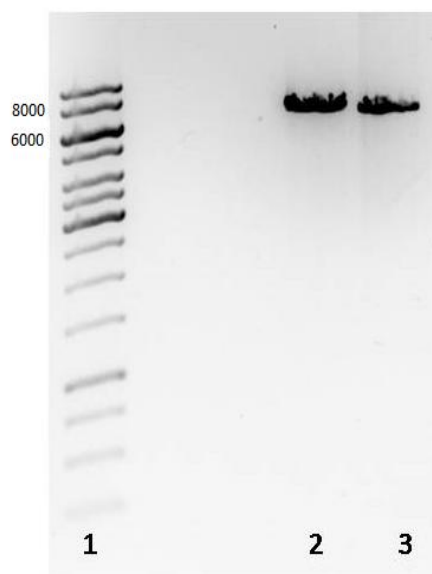
Obrázek 21: Grafické vyobrazení vektorů TOPO_RiresL (A) a TOPO_RL (B). Jedná se o vektory pCR4_TOPO s naklonovanou luciferázovou kazetou s T7 promotorem, respektive luciferázovou kazetou s T7 promotorem bez HCV IRES. Grafická forma vektorů byla připravena v programu *SnapGene ViewerTM*. Oba vektory obsahují gen pro resistenci na ampicilin (*AmpR*), gen pro resistenci na neomycin a kanamycin (*NeoR/KanR*), replikační počátek pro pomnožení vektoru v bakteriálním systému (pUC ori), nefunkční geny pro *LacZα-ccdB* a aparát pro iniciaci transkripce v bakteriálním systému (CAP vazebné místo, lac promotor a lac operátor). Původní vektor, pCR4_TOPO, obsahuje T7 promotor, který se dá použít pro sekvenování. V rámci našich experimentů s *in vitro* transkpcí nebyl tento promotor žádoucí, a proto jsme jej restrikcí enzymem *NotI* zbavili *downstream* lokalizované sekvence.



Obrázek 22: Vyobrazení *NotI* místa v sekvenci TOPO_RiresL vektoru. Na ekvivalentním místě u TOPO_RL se nachází stejné restrikční místo. Restrikční místo enzymu *NotI* se nachází těsně za reportérovou kazetou. Tato restrikce vyřazuje nepotřebný T7 promotor.

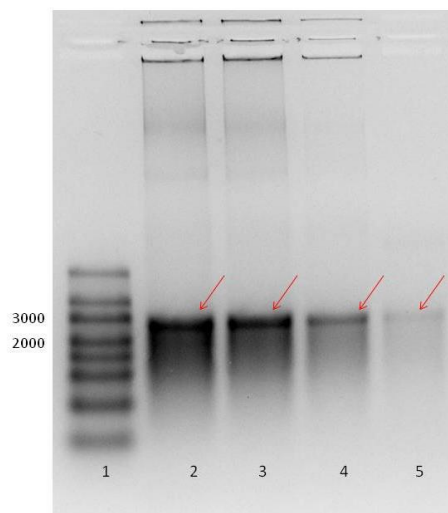
5.4.3 Příprava molekul RNA metodou *in vitro* transkripce

Metodikou popsanou v 5.4.2 jsme připravili molekuly RNA *in vitro* transkripce (4.2.4.3 *In vitro* transkripce). Jednalo se o molekuly RNA vzniklých z bicistronní reportérové kazety a kontrolní reportérové kazety. Během několika pilotních experimentů jsme se setkávali s různými komplikacemi. Na elektroforetogramu jsme nebyli schopni detekovat žádné pruhy, které by odpovídaly transkriptům RNA vzniklých *in vitro* transkripční reakcí, u vzorků, které byly podrobeny degradaci DNA pomocí komerční soupravy *TURBO DNA-freeTM kit* (viz 4.1.4 Komerční soupravy). V jiných, případech jsme detekovali pruhy, které neodpovídaly očekávaným molekulovým hmotnostem. Proto jsme se rozhodli krok degradace DNA ve vzorcích z *in vitro* transkripce vynechat. Zároveň jsme usoudili, že krok degradace DNA ve vzorcích z *in vitro* transkripce není nezbytný pro následující experimenty.

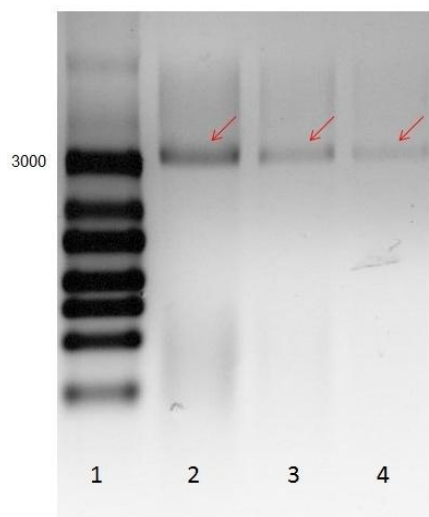


Obrázek 23: Elektroforetogram produktů restrikční reakce enzymem *NotI*. Elektroforetogram slouží jako kontrola kvality štěpení. Jako substrátová DNA pro enzym *NotI* byla použita molekula vektoru TOPO_RiresL, respektive TOPO_RL. Elektroforetogram je zobrazen v invertovaných barvách. U vybraných pruhů standardů molekulových hmotností je vyznačena délka v počtu párů bází, které odpovídají linearizovaným formám výše zmíněných vektorů. **1:** Standard molekulových hmotností, *GeneRuler 1kb DNA Ladder*. **2:** Vzorek restrikční reakce katalyzované enzymem *NotI*, pruh odpovídá linearizované formě vektoru TOPO_RiresL (7090 bp). **3:** Vzorek restrikční reakce katalyzované enzymem *NotI*, pruh odpovídá linearizované formě vektoru TOPO_RL (6705 bp).

V dalších experimentech jsme byli schopni připravit metodou *in vitro* transkripce molekuly RNA, odpovídající molekulovou hmotností produktům transkripčních jednotek linearizovaných vektorů TOPO_RiresL (viz Obrázek 24), respektive TOPO_RL (viz Obrázek 25) Obě výsledné RNA byly produktem *in vitro* transkripční reakce s analogem čepičky, molekulou m^7GTP .



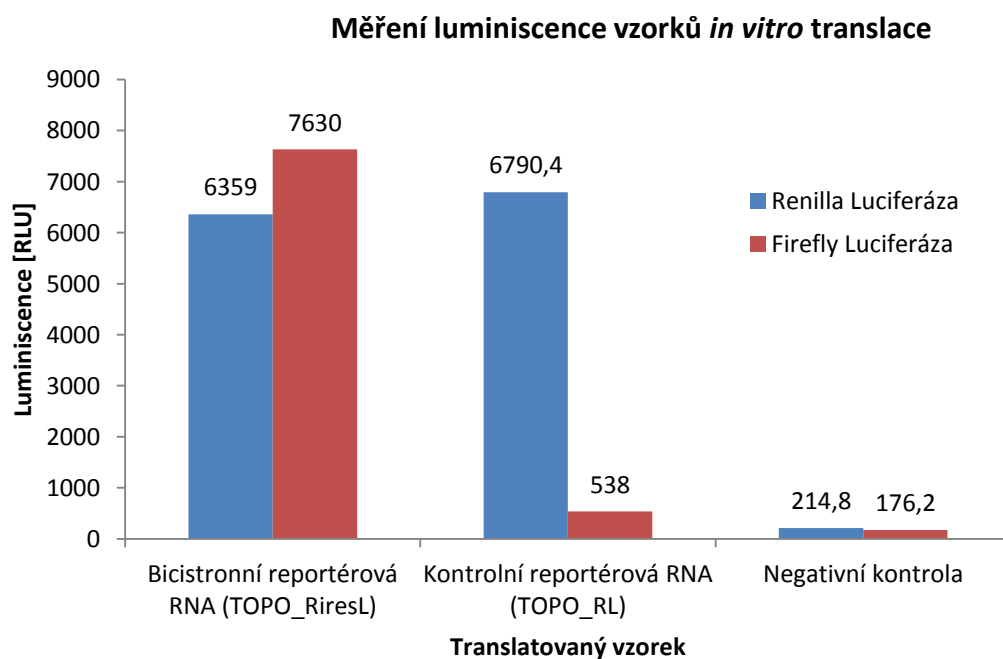
Obrázek 24: Elektroforetogram produktů reakce *in vitro* transkripce. Templátem v *in vitro* transkripci byl v tomto případě linearizovaný vektoru TOPO_RL. Linearizace byla uskutečněna restriční endonukleázou *NotI*. Elektroforetogram je zobrazen v invertovaných barvách. Červené šipky označují pruhy odpovídající požadovaným RNA produktům *in vitro* transkripce. U vybraných pruhů standardů molekulových hmotností je vyznačena délka v počtu nukleotidů, které odpovídají. 1: Standard molekulových hmotností, *RiboRuler RNA Ladder TranscriptAidTM*, součást *in vitro* transkripčního kitu. 2, 3, 4, 5: Vzorky ze stejné *in vitro* transkripční reakce, lišící se koncentrací. Objem vzorku 2 činil 3 μ l, objem vzorku 3 činil 2,4 μ l, objem vzorku 4 činil 1,8 μ l, objem vzorku 5 činil 1,2 μ l.



Obrázek 25: Elektroforetogram produktů reakce *in vitro* transkripce. Templátem v *in vitro* transkripci byl v tomto případě linearizovaný vektoru TOPO_RiresL. Linearizace byla uskutečněna restriční endonukleázou *NotI*. Elektroforetogram je zobrazen v invertovaných barvách. Červené šipky označují pruhy odpovídající požadovaným RNA produktům *in vitro* transkripce. U vybraného pruhu pro standard molekulové hmotnosti je vyznačena délka v počtu nukleotidů. 1: Standard molekulových hmotností, *RiboRuler RNA Ladder TranscriptAidTM*, součást *in vitro* transkripčního kitu. 2, 3, 4 : Vzorky ze stejné *in vitro* transkripční reakce, lišící se koncentrací. Objem vzorku 2 naneseného na elektroforézu činil 3 μ l, objem vzorku 3 činil 2,4 μ l, objem vzorku 4 činil 1,8 μ l.

5.4.4 Test funkčnosti luciferáz

Vzhledem k problémům s osekvenováním kompletních úseků kódujících oblastí obou luciferáz (viz 5.4.2 Sekvenování reportérových kazet a příprava zásobních vzorků) jsme se rozhodli otestovat integritu těchto sekvencí metodou *in vitro* translace s následným měřením aktivity luciferáz v DLR. Pokud bychom byli schopni detekovat signál obou luciferáz, znamenalo by to pro nás funkčnost obou výše zmíněných enzymů a tím i velmi pravděpodobně správnou sekvenci celé reportérové kazety. Zároveň bychom tak zjistili, zda jsme *in vitro* transkripcí schopni připravit takové molekuly RNA, které můžeme transfekovat do buněčné linie s tím, že vzniknou funkční proteiny. Pro metodu *in vitro* translace jsme se rozhodli použít komerční soupravu *Wheat germ extract*TM (*Promega*TM) (viz 4.1.4 Komerční soupravy). Při používání výše zmíněné soupravy jsme použili upravený protokol dodávaný se soupravou samotnou (viz 4.2.5.1 *In vitro* translace). Reakční směs jsme po ukončení *in vitro* translace použili jako vzorek pro DLR (viz Graf 1).



Graf 1: Měření luminiscence vzorků *in vitro* translace reportérových RNA metodou DLR. Na ose *x* označení jednotlivých vzorků RNA, která byla v *in vitro* translační reakci překládána. Negativní kontrola označuje vzorek bez přidané RNA pro translaci. Na ose *y* jsou vyneseny hodnoty naměřených relativních světelných jednotek (RLU) obou luciferáz. Jednotky vyobrazené nad jednotlivými sloupci grafu jsou průměrné hodnoty měření pro každou luciferázu ve vzorku. Vzhledem k charakteru hodnot a experimentu (jedno biologické opakování), jsme zvolili sloupcové zobrazení s průměrem pěti technických opakování měření jakožto reprezentativní hodnotou.

Na základě dat získaných z DLR měření směsi po *in vitro* translaci jsme usoudili, že jsme schopni metodou *in vitro* transkripce nasyntetizovat molekuly RNA, které mohou být translatovány *in vitro* a dát tak vznik obou funkčním luciferázám. Vzhledem k problémům, které jsme měli při sekvenaci bicistronní reportérové kazety a kontrolní reportérové kazety (viz 5.4.2 Sekvenování reportérových kazet a příprava zásobních vzorků), jsme výsledky z výše zmíněné DLR považovali za dostatečné z hlediska určení integrity kódujících sekvencí *Renilla* i *Firefly* luciferázy.

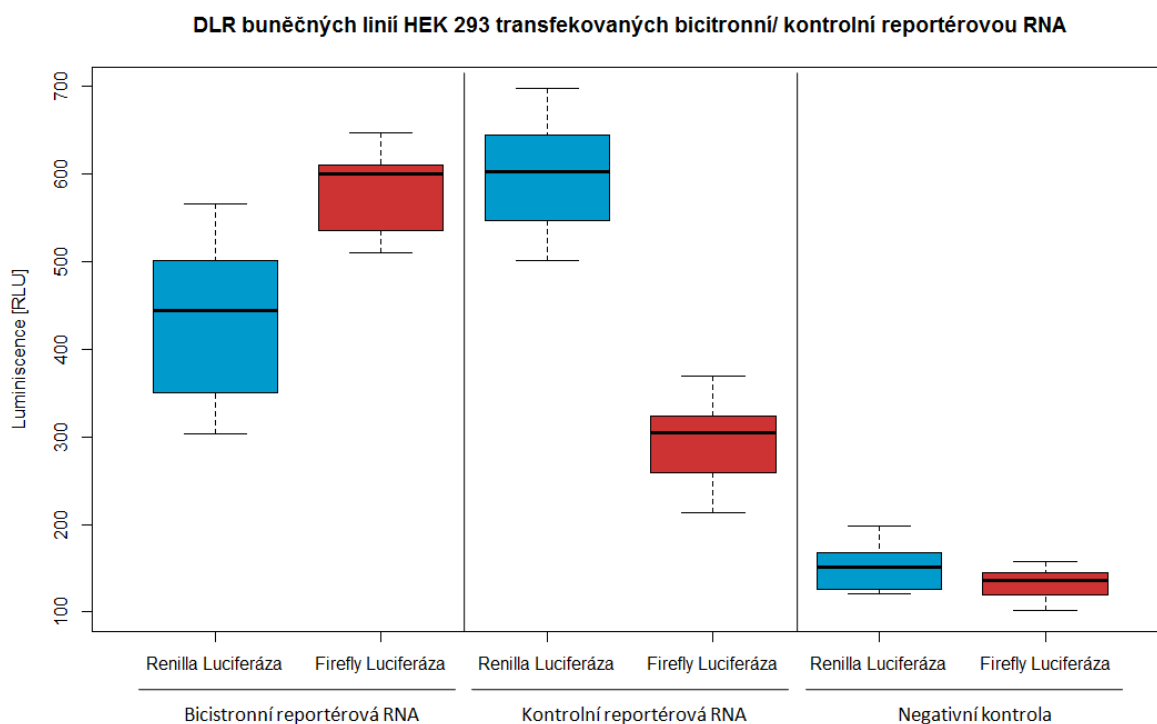
5.4.5 Transfekce buněčné linie molekulami RNA připravenými metodou *in vitro* transkripce

Poté co jsme nepřímo ověřili integritu reportérové kazety ve vektorech TOPO_RiresL a TOPO_RL jsme byli schopni přistoupit k dalšímu kroku přípravy reportérového systému. Bylo nezbytné připravit způsob jakým transfekovat molekuly syntetizované metodou *in vitro* transkripce do buněčné linie našeho zájmu, tedy linie HEK 293. Transfekce buněčné linie HEK 293 jsme chtěli dosáhnout jedním z dvou transfekčních činidel vhodných pro transfekci RNA, kterými naše laboratoř disponuje. Jednalo se o *Lipofectamin*[®] 2000 (*Thermo Scientific*TM) a *RiboCellin* (*BioCellChallenge*TM) (viz 4.2.2.6 Transfekce buněčné linie molekulami RNA).

Po ověření naší schopnosti transfekovat buněčnou linii pomocí výše zmíněných transfekčních činidel jsme se rozhodli analyzovat úspěšnost transfekce pomocí značených oligonukleotidů (BLOCK-iTTM Alexa Fluoro[®] Red Fluorescent Control a BLOCK-iTTM Fluorescent Control) a průtokové cytometrie. Tento experiment prováděl školitel, proto není postup v metodách a značené oligonukleotidy v materiálech. Na základě výsledků z průtokové cytometrie (data nejsou uvedena) jsme dospěli k závěru, že transfekce zprostředkovaná transfekčním činidlem *RiboCellin* je účinnější a pro naše experimenty vhodná.

Jako první krok jsme transfekovali buněčnou linii HEK 293 reportérovými molekulami RNA. Chtěli jsme zjistit, zda-li dokážeme reprodukovat výsledky z *in vitro* systému i v systému *in vivo*, což byl nezbytný krok v přípravě reportérového systému, na kterém bychom testovali samotný vliv proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace nezávislé na čepičce. Buněčnou linii HEK 293 jsme transfekovali reportérovými molekulami RNA za pomoci transfekčního činidla *RiboCellin*

(viz 4.2.2.6 Transfekce buněčné linie molekulami RNA). Tento experiment jsme provedli ve dvou biologických opakováních (viz Graf 2).



Graf 2: Měření DLR vzorků buněčné linie HEK 293 transfekovaných bicistronní nebo kontrolní reportérovou RNA. K transfekci bylo použito transfekční činidlo *RiboCellin*[®] (viz 4.1.13 Transfekční činidla). Měření DLR vzorků buněčné linie HEK 293 transfekované bicistronní reportérovou RNA: *Renilla luciferáza*: medián = 444; sd = 89,99. *Firefly luciferáza*: medián = 600,5; sd = 47,12. Měření DLR vzorků buněčné linie HEK 293 transfekované kontrolní reportérovou RNA. *Renilla luciferáza*: medián = 602; sd = 64,72. *Firefly luciferáza*: medián = 304,5; sd = 54,7. Tučná úsečka: medián. Úsečky vyznačují rozptyl: minimum a maximum.

Na základě znalostí, kterými disponuje naše laboratoř v oblasti měření luminiscence luciferáz, jsme dospěli k názoru, že výsledky měření (viz Graf 2), mohou být zastřeny nízkou koncentrací obou luciferáz ve vzorcích. Nízké zastoupení obou výše zmíněných proteinů je nejspíše způsobeno systémem samotným, který zahrnuje transfekci molekul RNA. Krok translace kódujících sekvencí na reportérových molekulách RNA tak jako jediný předurčuje množství *Renilla luciferázy* a *Firefly luciferázy* v buňce. Na základě námi prezentovaných výsledků usuzujeme, že množství, kterého jsme schopni dosáhnout pro transfekci buněčné linie HEK 293 ve výše zmíněných experimentech, není dostatečné pro pozorování jakéhokoliv

efektu na úrovni translace. Spolu s problémy, které nás provázely při tvorbě reportérových molekul RNA (viz 5.4.3 Příprava molekul RNA metodou *in vitro* transkripce) jsme se rozhodli reportérový systém, využívající transfekci buněčné linie pomocí RNA, zavrhnout.

5.5 Příprava reportérového systému, transientní transfekce

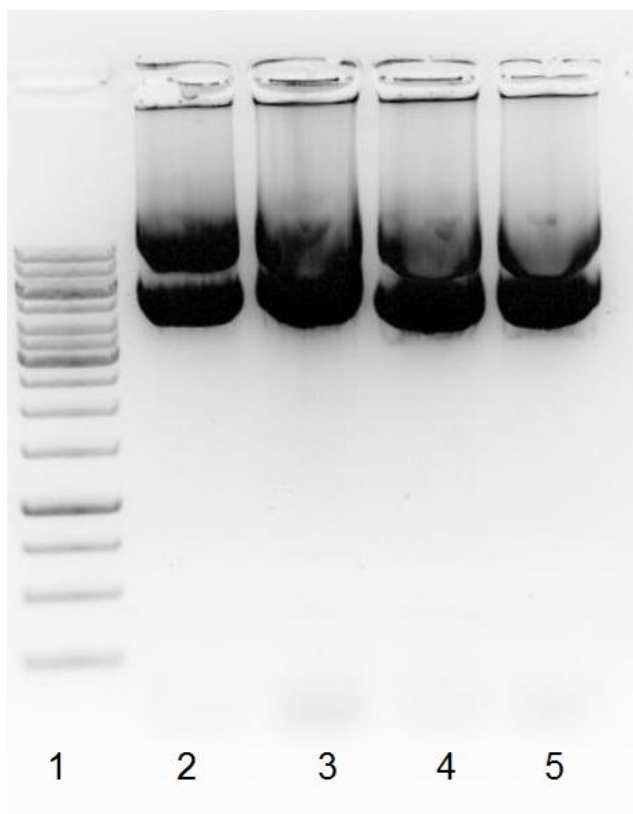
Naše předchozí způsoby přípravy reportérového systému nebyli úspěšné. Jako další možnost vytvoření reportérového systému jsme zvolili transientní transfekci. Tato možnost se na našem seznamu vyskytovala až na třetí pozici, a to z několika důvodů. Vedle již zmíněného kryptického promotoru, který sekvence IRES zahrnuje, hrála roli i jistá forma nepohodlí v podobě několika následných transfekcí buněčných kultur. Dalším ohrožením funkčnosti systému založeného na transientní transfekci měli potenciální komplikace spojené s transientní transfekcí jako takovou. Vzhledem k naší nespokojenosti s kvalitou nebo tvorbou reportérových systémů, které jsme již vyzkoušeli, bylo možnost transientní transfekce nezbytné otestovat.

5.5.1 Transientní transfekce buněčné linie HEK 293 a použité vektory

Pro transientní transfekci jsme se rozhodli opět použít buněčnou linii HEK 293. Vektory, pomocí kterých jsme se snažili připravit stabilní linie pro exprese genů bicistronní reportérové kazety a kontrolní reportérové kazety, pcDNATM/FRT/TO/RiresL a pcDNATM/FRT/TO/RL, jsme se rozhodli použít i v experimentech transientní transfekce.

Nejprve jsme se rozhodli připravit zásobní roztoky obou výše zmíněných vektorů. Vektor obsahující bicistronní reportérovou kazetu a následně i vektor s kontrolní reportérovou kazetou jsme transformovali do bakterií *E.coli* XL-1 *Blue* metodou elektroporace (viz 4.2.1.1 Transformace buněk *E.coli* metodou elektroporace). Bakterie jsme vyseli na Petriho misku s agarózovým médiem 2xTY s ampicilinem. Druhý den jsme vybrané kolonie přeočkovali do větší plochy na Petriho misky s agarózovým médiem 2xTY s ampicilinem. Následující den jsme injikovali kolonie do tekutého média 2xTY s ampicilinem v Erlenmayerově nádobě podle metody midipreparace bez endotoxinů (viz 4.2.3.2 Izolace vzorků

z bakteriálních kultur bez endotoxinů). U výsledných roztoků obou vektorů jsme určili koncentraci (viz 4.2.3.3 Měření koncentrace DNA pomocí NanoDrop® ND-1000 *Spectrophotometer*) a zkontrolovali jsme jejich kvalitu vektorů na elektroforéze (viz Obrázek 26).



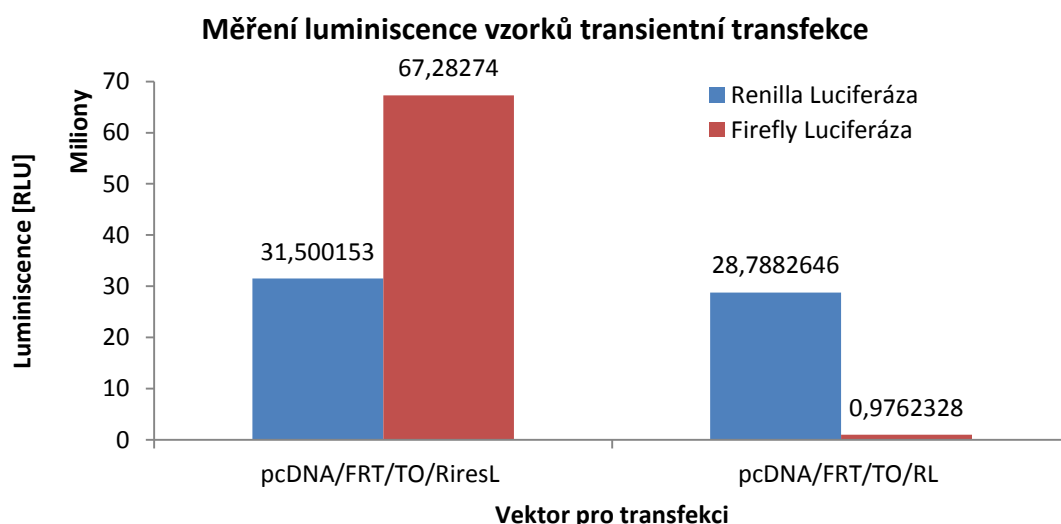
Obrázek 26: Elektroforetogram kontroly kvality vektorů pcDNATM/FRT/TO/RiresL a pcDNATM/FRT/TO/RL. **1:** Standard molekulových hmotností, *GenRuler 1kb DNA Ladder*. **2:** Vzorek vektoru pcDNATM/FRT/TO/RiresL. **3:** Druhý vzorek vektoru pcDNATM/FRT/TO/RiresL. **4:** Vzorek vektoru pcDNATM/FRT/TO/RL. **5:** Druhý vzorek vektoru pcDNATM/FRT/TO/RL. Všechny vzorky byly izolovány stejnou metodou, midipreparace, která zajistila zbavení se endotoxinů (viz 4.2.3.2 Izolace vzorků z bakteriálních kultur bez endotoxinů).

Na základě výsledků výše zmíněných metod jsme usoudili, že jsme připravili dostatečné množství vektoru o vhodné kvalitě. Takto připravené vektory pcDNATM/FRT/TO/RiresL a pcDNATM/FRT/TO/RL jsme mohli použít pro transientní transfekci buněčné linie HEK 293.

V reakci na výsledky přípravy reportérového systému spojeného s přípravou reportérových molekul RNA *in vitro* a jejich následnou transfekcí, jsme si kladli dotaz, zda jsme schopni detekovat aktivitu *Renilla* i *Firefly* luciferázy po transientní transfekci buněčné linie vektory a zda-li je aktivita (a tedy i koncentrace proteinu a příslušné mRNA) dostatečně vysoká, aby při eventuálním snížení aktivity luciferáz

bylo možné odlišit snížení iniciace translace od problémů, které by mohli souviset s transfekcí nebo mutací vektoru. Pro zodpovězení tohoto dotazu jsme se nejprve rozhodli otestovat reportérový systém založený na transientní transfekci bez jiného zásahu.

Pro transfekci buněčné linie HEK 293 výše zmíněnými vektory jsme se rozhodli použít lipofekci pomocí transfekčního činidla *Lipofectamin*[®] 2000 (*Thermo Scientific*[™]) (viz 4.2.2.5 Transfekce buněčné linie molekulami DNA). Po 48 hodinách jsme odebrali vzorky podle metody DLR (viz 4.2.5.8 Duální luciferázový test). Změřili jsme koncentraci proteinů (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA) pro korelaci aktivit luciferáz v jednotlivých vzorcích a změřili jsme aktivitu *Renilla* a *Firefly* luciferáz ve vzorcích (viz Graf 3).

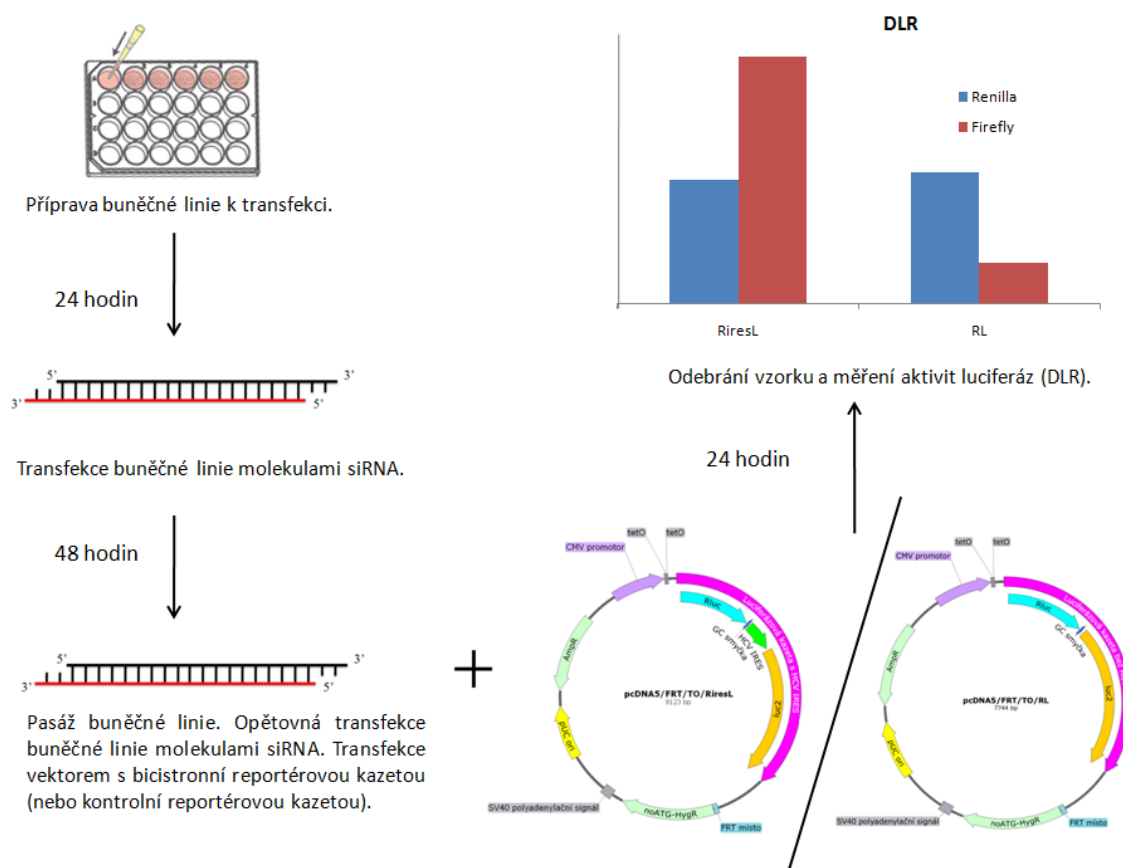


Graf 3: Měření luminiscence vzorků buněčné linie HEK 293 transfekované vektory pcDNA[™]/FRT/TO/RiresL, respektive pcDNA[™]/FRT/TO/RL. Na ose *x* se nachází označení vektorů, jimiž jsme transfekovali buněčnou linii. Na ose *y* jsou vyneseny hodnoty naměřených relativních světelných jednotek (RLU) obou luciferáz. Pro transfekci bylo použito transfekční činidlo *Lipofectamin*[®] 2000 (*Thermo Scientific*[™]). Na základě těchto výsledků jsme usoudili, že jsme schopni pomocí transientní transfekce připravit reportérový systém, které produkuje dostatečné množství *Renilla* i *Firefly* luciferázy. K experimentu jsme připravili i negativní kontrolu, která nebyla transferována, k buněčné linie bylo pouze přidáno odpovídající množství transfekčního činidla. Hodnoty luminiscence dosahovali v průměru hodnot 1954 RLU pro *Renilla* luciferázu a 1547 RLU pro *Firefly* luciferázu. Z technických důvodů tvorby grafu jsme se rozhodli je do zobrazení nepřidat. Jednotky vyobrazené nad jednotlivými sloupci grafu jsou průměrné hodnoty měření pro každou luciferázu ve vzorku. Vzhledem k charakteru hodnot a experimentu (jedno biologické opakování), jsme zvolili sloupcové zobrazení s průměrem pěti technických opakování měření jakožto reprezentativní hodnotou vyobrazenou nad jednotlivými sloupci.

5.5.2 Transientní transfekce buněčné linie HEK 293 reportérovými vektory a umlčení proteinkináz ERK1 a ERK2

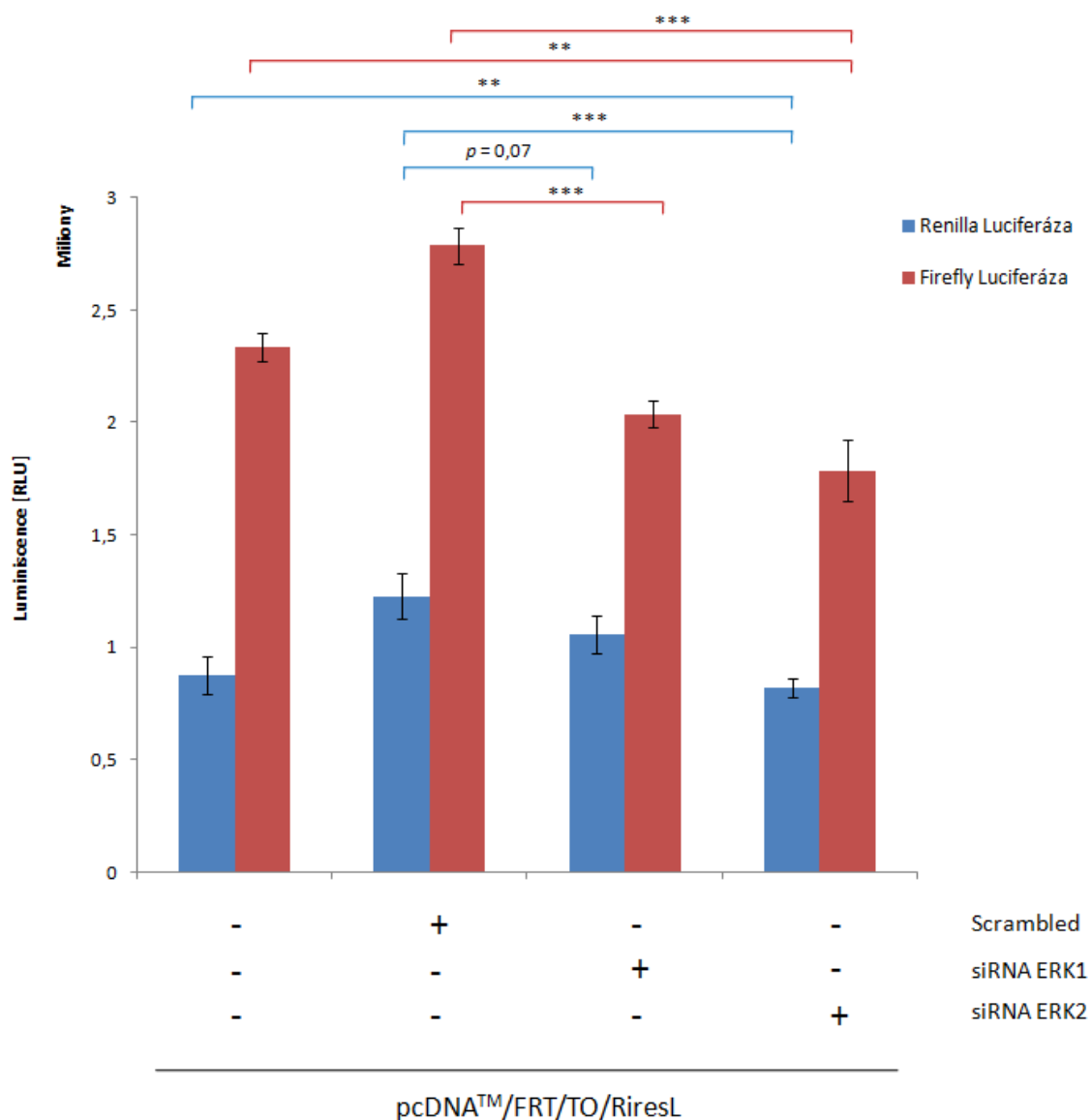
Z výsledků experimentu v předchozí kapitole jsme usoudili, že jsme schopni připravit reportérový systém, na kterém můžeme testovat vliv proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na elementu HCV IRES.

Po několika přípravách experimentálního postupu, jsme nakonec uplatili přístup znázorněný na obrázku 27. Tento experimentální postup zajišťoval umlčení proteinkináz ERK1, respektive ERK2 v době, kdy jsme uskutečnili transientní transfekci.

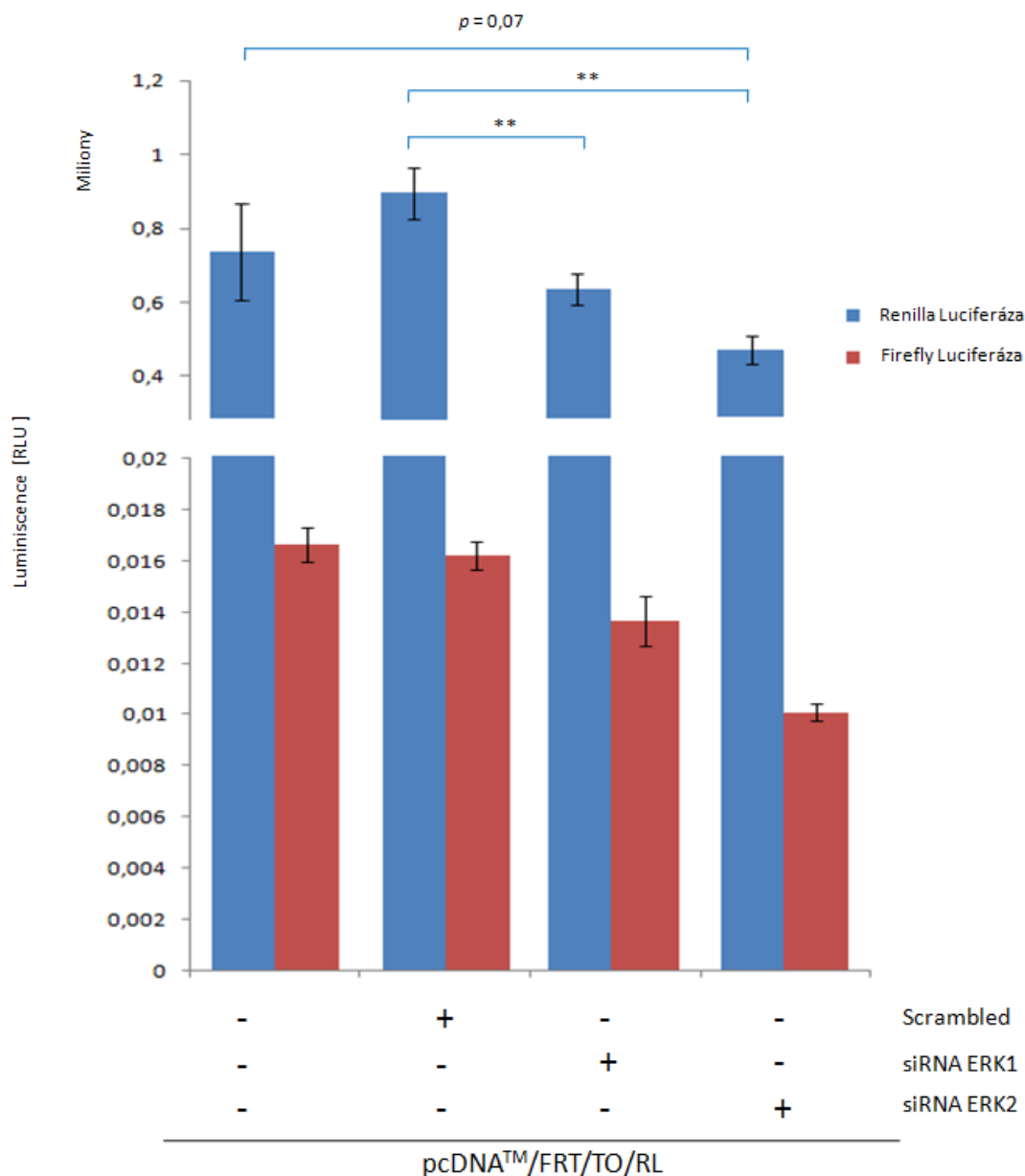


Obrázek 27: Grafické schéma experimentálního postupu, který jsme uplatnili v této práci. Při přípravě buněčné linie k transfekci jsme postupovali podle 4.2.2.4 Příprava pro transfekci buněčných linií. Při transfekci buněčné linie molekulami siRNA jsme postupovali podle 4.2.2.6 Transfekce buněčné linie siRNA. Při transfekci buněčné linie vektorem s bicitronní reportérovou kazetou, respektive kontrolní reportérovou kazetou, jsme postupovali podle 4.2.2.5 Transfekce buněčné linie molekulami DNA. Měření aktivity luciferáz jsme uskutečnili podle 4.2.5.8 Duální luciferázový test. Graf zobrazující výsledky měření DLR je ilustrační. Obrázek 24 jamkové destičky byl převzat z ibidi®.

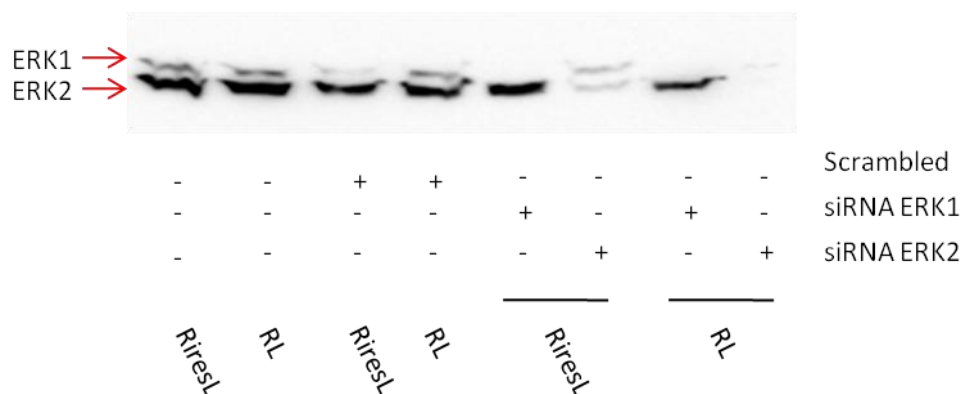
Experiment zahrnoval více vzorků. Podle schématu (viz Obrázek 27) jsme nejdříve transfekovali buněčné linie HEK 293 molekulami siRNA cílící mRNA proteinů ERK1, respektive ERK2. Dále jsme použili negativní kontrolu v podobě Scrambled siRNA (viz 4.1.7 siRNA). Všechny výše zmíněné transfekce jsme provedli dvakrát, abychom mohli transfekovat určité buněčné linie vektorem s bicistronní reportérovou kazetou (pcDNATM/FRT/TO/RiresL), respektive vektorem s kontrolní reportérovou kazetou bez HCV IRES (pcDNATM/FRT/TO/RL). Také jsme připravili vzorky, které byly transfekované pouze vektorem (tj. bez jakékoliv siRNA) a to buď pcDNATM/FRT/TO/RiresL, nebo pcDNATM/FRT/TO/RL. Experiment jsme provedli ve třech biologických opakováních. Měření aktivit luciferáz proběhlo v pěti opakováních pro každý biologický replikát. Výsledky získané metodou DLR (viz 4.2.5.8 Duální luciferázový test) byly korelovány ke koncentraci proteinů změřených metodou BCA (viz 4.2.5.3 Měření koncentrace proteinů metodou BCA) výsledné hodnoty jsou prezentovány v grafu 4 a grafu 5. Úspěšnost umlčení ERK1, respektive ERK2, pomocí siRNA byla kontrolována metodou imunodetekce po *western blotu* (viz 4.2.5.5 *western blot* a 4.2.5.6 Imunodetekce) (viz Obrázek 28).



Graf 4: Měření aktivity *Renilla* a *Firefly* luciferázy metodou DLR. Experimentální postup podle Obrázku 27. Vybrané vzorky buněčné linie HEK 293 byly transfekovány molekulami siRNA ERK1, respektive ERK2 nebo Scrambled (viz 4.2.2.6 Transfekce buněčné linie siRNA). Vzorky buněčná linie HEK 293 byly transfekovány vektorem pcDNATM/FRT/TO/RiresL (viz 4.2.2.5 Transfekce buněčné linie molekulami DNA). Měření aktivity obou výše zmíněných luciferáz proběhlo metodou DLR (viz 4.2.5.8 Duální luciferázový test) spolu se statistickou analýzou. p -hodnota < 0,05, * ; p -hodnota < 0,01, ** ; p -hodnota < 0,001, ***. Úsečky vyznačují vzdálenost -1 až 1 sd.



Graf 5: Měření aktivity *Renilla* a *Firefly* luciferázy metodou DLR. Experimentální postup podle Obrázek 27. Vybrané vzorky buněčné linie HEK 293 byly transfekovány molekulami siRNA ERK1, respektive ERK2 nebo Scrambled (viz 4.2.2.6 Transfekce buněčné linie siRNA). Vzorky buněčná linie HEK 293 byly transfekovány vektorem pcDNATM/FRT/TO/RL (viz 4.2.2.5 Transfekce buněčné linie molekulami DNA). Měření aktivity obou výše zmíněných luciferáz proběhlo metodou DLR (viz 4.2.5.8 Duální luciferázový test), spolu se statistickou analýzou. p -hodnota < 0,05, * ; p -hodnota < 0,01, ** ; p -hodnota < 0,001, ***. Úsečky vyznačují vzdálenost -1 až 1 sd.



Obrázek 28: Imunodetekce vzorků buněčných linií transfekovaných siRNA ERK1/ siRNA ERK2/ Scrambled a pcDNATM/FRT/TO/RiresL (označených RiresL), respektive pcDNATM/FRT/TO/RL (označených RL). SDS-PAAGE, *western blot*, Imunodetekce a následná analýza byla provedena podle 4.2.5.4 Gelová elektroforéza SDS-PAAGE, 4.2.5.5 *western blot* a 4.2.5.6 Imunodetekce- Při umlčení mRNA pro ERK2 jsme opět pozorovali podobný efekt snížení hladiny proteinu ERK1, stejně jako v předchozích případech (viz Obrázek 17). Nicméně u vzorku siRNA ERK2/RL byl tento efekt opakovaně nejvíce pozorovatelný a kromě výše zmíněného důvodu se u těchto experimentů projevily i jiné příčiny. V některých případech mohl být výše zmíněný efekt způsoben problémem při imunodetekci, kterou jsme pozorovali i při jiných experimentech zahrnující tuto metodu.

Podle výsledků zobrazených v grafu 4 naměřené hodnoty a následná statistická analýza ukazuje vliv enzymu ERK1 na iniciaci translace závislé na čepičce, jako shodný s nulovou hypotézou, na hladině pravděpodobnosti 95%. Proteinkináza ERK1 by tedy neměla mít vliv na iniciaci translace závislé na čepičce. Nicméně podle dat naměřených ve vzorcích transfekovaných kontrolním reportérovým reportérovým vektorem pcDNATM/FRT/TO/RL, je pozorován pravý opak výše zmíněného výsledku (viz Graf 5). Jelikož se u obou měření, tedy u vzorků transfekovaných bicitronním reportérovým vektorem, respektive kontrolním reportérovým vektorem, objevuje stejný trend (viz Graf 4 a 5), který pozorujeme při umlčení proteinkinázy ERK1 i ERK2, je pravděpodobnější, že se ERK1 bude chovat v těchto experimentálních podmínkách totožně s ERK2, tedy jako pozitivní regulátor. Tento závěr posilují data v grafu 5, kde by se měla detekovat pouze aktivita *Renilla* luciferázy, enzymu jehož translace je v našem reportérovém systému závislá na čepičce.

Na základě výsledků prezentovaných v Grafu 4 a 5 a na Obrázku 28 usuzujeme, že proteinkináza ERK1 a ERK2 má pozitivní vliv na iniciaci translace, která je závislá na čepičce, respektive na HCV IRES.

5.5.2.1 Poměr aktivit luciferáz

Dalším způsobem, kterým je možno prezentovat data získaná experimenty zahrnující dvě luciferázy (v našem případě *Renilla* luciferáza a *Firefly* luciferáza) je výpočet poměru aktivit jedné luciferázy k druhé luciferáze. Výsledná hodnota poměru se pak dá porovnat s hodnotou z dat získaných za jiných experimentálních podmínek. Na základě rozdílů hodnot poměrů se dá zjistit, jak se měnily aktivity luciferáz v rámci jednoho vzorku (viz Tabulka 3).

Na základě rozdílnosti výsledků, které jsme získali vyhodnocením dat aktivit luciferáz ze vzorků transfekovaných siRNA ERK1/ pcDNATM/FRT/TO/RiresL a siRNA ERK1/ pcDNATM/FRT/TO/RL (viz Grafy 4 a 5) jsme se rozhodli podrobit poměry aktivit *Firefly* luciferázy k *Renilla* luciferáze z jednotlivých biologických opakování výše zmíněných experimentů statistické analýze.

Naše teorie byla opřena o následující myšlenku: pokud má proteinkináza ERK1, respektive ERK2 vliv pouze na iniciaci translace závislou na čepičce nebo pouze na HCV IRES, projeví se to na aktivitě jen jedné z luciferáz. Taková změna bude pozorovatelná v poměru aktivit obou luciferáz.

Naše alternativní hypotéza zněla dle výše popsané teorie následovně: pokud se liší poměry aktivit obou luciferáz mezi experimentálními podmínkami v alespoň jednom experimentu, mají tyto podmínky vliv na iniciaci translace pouze jedné z luciferáz.

Experimentální podmínky	Poměr aktivit <i>Firefly</i> / <i>Renilla</i> luciferáz v 1. biologickém opakování	Poměr aktivit <i>Firefly</i> / <i>Renilla</i> luciferáz v 2. biologickém opakování	Poměr aktivit <i>Firefly</i> / <i>Renilla</i> luciferáz v 3. biologickém opakování
pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	1,237	2,975	2,04
Scrambled + pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	1,263	1,438	2,26
siRNA ERK1 + pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	1,24	1,323	1,93
siRNA ERK2 + pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	1,19	1,513	2,17
pcDNA TM /FRT/TO/RL	0,803	0,85	0,023
Scrambled + pcDNA TM /FRT/TO/RL	0,804	0,805	0,018
siRNA ERK1 + pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	0,804	0,806	0,021
siRNA ERK2 + pcDNA TM /FRT/TO/RiresL	0,804	0,806	0,021

Tabulka 3: Poměr aktivit *Firefly* / *Renilla* luciferáz v jednotlivých biologických opakování při různých experimentálních podmínkách.

Výše prezentovaná data (viz Tabulka 3) jsme podrobili statistickým analýzám: kontrole normality dat a analýze rozptylu (viz 4.2.6 Statistická analýza dat). Mezi poměry aktivit luciferáz jednotlivých biologických opakování jsme na hladině významnosti 95% nezjistili signifikantní výsledek. Z těchto výsledků usuzujeme, že vliv proteinkináz ERK1, respektive ERK2, se projevuje iniciací translace obou jak *Renilla* tak *Firefly* luciferáz. S tímto poznatkem se vracíme k již zmíněnému výsledku (viz výše, 5.2.2 Transientní transfekce buněčné linie HEK 293 reportérovými vektory a umlčení proteinkináz ERK1 a ERK2), kde tvrdíme, že proteinkináza ERK1 a ERK2 má pozitivní vliv na iniciaci translace, která je závislá jak na čepičce, tak i závislá na HCV IRES.

6 Diskuze

RNA interference je nyní běžně používaná metoda v mnoha laboratořích, kde tento přístup přispěl k mnoha podstatným výsledkům a objevům. V naší laboratoři nebylo do doby před tématem popsaným v této diplomové práci potřeba tuto metodu zavádět. Proto se náš první úkol setkával s mnohými problémy, které souvisely s novými přístupy. Po vybrání vhodné buněčné linie (viz 5.1 Buněčná linie pro zavedení metody RNA interference) jsme přistoupili k optimalizaci transfekce a umlčení pomocí siRNA (viz 5.2 Zavedení metody RNA interference pomocí siRNA). První siRNA, kterou jsme testovali (siERK1, viz 4.1.7 siRNA) nám přinesla mnohé problémy, které se nám podařilo odhalit (viz 5.2.1 miRNA-like efekt). Vedle miRNA-like efektu se dá spekulovat i o dalších faktorech, které mohly hrát roli při neúspěchu našich experimentů. Například fakt, že siRNA byla vytvořena pouze na základě známé sekvence u komerční firmy a nebyla tedy zakoupena se zabudovanými chemickými modifikacemi (viz 3.1 RNA interference) mohl ubírat na kvalitě produktu, a tedy i vědeckému experimentu. Z několika důvodů si však myslíme, že naše pozorování opravdu vypovídá o miRNA-like efektu. Například výsledky v části této práce zabývající se odhalením miRNA-like efektu poukazují na tento fenomén v několika různých experimentech (viz 5.2.1 miRNA-like efekt). Pravdou je, že tyto výsledky nejsou pozorováním z více nezávislých experimentů, nýbrž jednoho biologického opakování. Učinili jsme tak, protože se nejednalo o práci, která by přidala poznání do pole buněčné biologie, nýbrž se jednalo o naši potřebu. Vzhledem k cílům této práce si myslíme, že je nezbytné aby, zde byly tyto výsledky prezentovány.

Dalším faktem, který poukazuje na miRNA-like efekt v našich pozorováních je skutečnost, že kdysi komerčně dostupný ekvivalent siRNA, která byla použita v práci Casanova *et al.* 2012, a tedy siRNA o totožné sekvenci jako naše první použitá siRNA (siERK1), byla stažena z prodeje. Důvodem této události jsou dle vyjádření prodávající firmy „nepředpokládané účinky“ tohoto produktu u některých vzorků. Dle našeho názoru tyto blíže nespecifikované účinky byly důsledkem miRNA-like efektu. Od doby stažení této siRNA z prodeje se však leccos změnilo. Firma byla koupena jinou firmou (*ThermoFisherTM Scientific*) a tento nový vlastník tuto siRNA opět prodává.

Pro objasnění efektu proteinkinázy ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES, jsme kromě RNAi potřebovali i funkční systém, na kterém by se dal výše popsáný děj studovat. Naší první volbou byla příprava stabilní linie. S touto metodou jsme měli určité problémy (viz 5.3 Příprava stabilních buněčných linií) a rozhodli jsme se od ní ustoupit. Další variantou byla příprava reportérových RNA molekul *in vitro* a následná transfekce do buněčné linie. S tímto přístupem jsme částečně uspěli, přesto jsme měli jisté problémy (viz 5.4 Příprava reportérového systému, *in vitro* transkripce). Kromě vytvořených RNA molekul jsme pozorovali i jiné produkty. Nemyslíme si, že by to byly následky degradace RNázami, nýbrž problémy s transkripcí jako takovou způsobenou komplikovanou primární strukturou některých úseků reportérové kazety. Problém podobného charakteru nejspíše způsobil i komplikace při sekvenování reportérových kazet. Při této reakci se nám prakticky nepovedlo detekovat kvalitu GC smyčky, ale i jiných úseků. Proto jsme zvolili alternativní způsob zjištění integrity cistronů. V případě reportérové kazety jsme tak uskutečnili metodou *in vitro* translace. Stejně jsme přistoupili i ke kontrolní kazetě. Přesto, že bychom v případě kontrolní kazety neměli detekovat *Firefly* luciferázu. Předpokladem je, že *Firefly luciferáza* vychází ze stejného zdroje a jedná se tedy o identickou sekvenci. Navíc byla PCR reakce před klonováním do TOPO vektoru zprostředkována enzymem Pwo, tedy polymerázou s reparační aktivitou. Pravděpodobnost mutace způsobenou PCR se tedy snížila.

Transfekce molekul RNA nám přinesla data s poměrně nízkými hodnotami luminiscence jednotlivých luciferáz (viz Graf 2). Data vykazují hodnoty luminiscence nižší, než při transienční transfekci a nižší v porovnání s jinými experimenty používající obdobný systém. Rozdíl je v rozmezí řádů (viz Graf 2 a Graf 3). Usoudili jsme tedy, že případné změny v hladinách detekovaného světla ve směru dolů, by se mohli podobat negativním kontrolám a v takovém případě bychom nebyli schopni určit, zda jsou luciferázy vůbec přítomny. Pro vhodný systém by vyhovovali vyšší hodnoty, jakých jsme docílili u transienční transfekce vektorů.

Transientní transfekce nám poskytla vyšší hodnoty relativních světelných jednotek, data jsou dle našeho názoru reprezentativnější. Navíc se nám podařilo opakovaně umlčovat expresi proteinů ERK1, respektive ERK2. V třech biologických opakováních jsme získali množství dat, které bylo dostatečné pro statistickou analýzu. Na základě pozorovaných dat a vhodně zvolené statistické analýze jsme

dospěli k názorům, které jsou prezentovány nejen v průběhu kapitoly výsledky v celé kapitole 5.5 Příprava reportérového systému, transientní transfekce a v příslušných podkapitolách.

Naše výsledky poukazují na dva fenomény, v jednom případě působí ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES jako pozitivní regulátory. Při nepřítomnosti jedné ze dvou proteinkináz dochází ke snížení iniciace translace závislé na virovém elementu. Zároveň ukazujeme, že iniciace translace závislá na čepičce je také do jisté míry závislá na proteinech ERK1, respektive ERK2. Na základě zde prezentovaných výsledků je tedy pravděpodobné, že ERK1/2 působí jako pozitivní regulátor iniciace translace obecně.

V odborné literatuře se vyskytují práce, které popisují vliv ERK1/2 na translaci, skrze jeden hlavní mechanismus. Proteinkináza ERK1/2 fosoryluje a tak inaktivuje protein TSC2. Tento protein se chová jako GAP pro malý G protein Rheb, jenž je v aktivní formě nezbytný pro aktivaci mTORc1. Komplex mTORc1 fosoryluje protein 4E-BPs a dovoluje tak iniciaci translace závislé na čepičce. Proteinkináza ERK1/2 je spjata i s dalším substrátem, který se podílí na iniciaci translace určité množiny mRNA. Jedná se o MNK1/2, proteinkinázy fosorylující eIF4E (konkrétně isoformu eIF4E1). Fosorylací eIF4E díky MNK1/2 dochází k změně translačního profilu buňky, tj. většina mRNA má inhibovanou iniciaci translace, naproti tomu malá skupina mRNA má zvýšenou iniciaci translace (viz 3.7 MAPK/ERK kaskáda a regulace translace). Vliv aktivních forem ERK1/2 na iniciaci translace závislé na čepičce se zdá být jasný, avšak vliv na iniciaci translace, která není závislá na čepičce, není stejně dobře prozkoumaným tématem.

Práce skupiny Murata *et al.* prezentuje výsledky experimentů, kde po inhibici MAPK/ERK pomocí nízkomolekulárních inhibitorů došlo k zvýšení iniciace translace závislé na HCV IRES. Podobné výsledky získala skupina při použití ektopicky exprimované, nefosforylovatelné, formy 4E-BP. Zajímavé je, že při inhibici MAPK/ERK nebyl pozorován vliv na iniciaci translace závislé na čepičce, přestože podpurný efekt MAPK/ERK na mTORc1 je již publikován. Při inhibici MNK1/2 se nezměnila IRES závislá iniciace translace, čímž je vyřazena možnost vlivu fosforylované formy eIF4E1 na IRES závislou iniciaci translace. Otázkou zůstává, proč autoři zmíněné práce nepoužili siRNA rozpoznávající mRNA pro protein ERK1,

respektive ERK2 a namísto toho použili, byť údajně velmi specifické, nízkomolekulární inhibitory (Murata *et al.* 2005).

Autoři výše zmíněné práce se odkazují na fyziologicky relevantní poznatky, kdy iniciace translace závislá na buněčných IRES je upřednostňována během G2/M fáze a mitózy, tedy ve fázích buněčného cyklu, kdy je MAPK/ERK signalizace nejslabší (Tamemoto *et al.* 1992).

Informace, které nám poskytl dr. Thoma (viz Úvod) také popisovaly opačné výsledky, konkrétně, že ERK2 je negativním regulátorem iniciace translace závislé na HCV IRES.

Naše pozorování se však shoduje s daty skupiny Herbert *et al.* Tato skupina ve své práci prezentuje data, o fosforylaci 4E-BP, která je indukovaná proteinkinázou ERK1/2, avšak nepřímým způsobem (Herbert *et al.* 2002). Při vyřazení ERK1/2 z funkce, by se tedy měl projevit opačný efekt na iniciaci translace, která je závislá na čepičce. Toto jsme schopni pozorovat v našem reportérovém systému za experimentálních podmínek.

Dle našeho názoru, který vychází z našich pozorování, usuzujeme, že vliv ERK1/2 na iniciaci translace je z fyziologického hlediska opodstatněný. Snížení hladiny ERK1/2 by tedy mělo mít vliv na iniciaci translace, která je závislá na čepičce. Tento efekt by vycházel skrze inhibici TSC2 proteinu v komplexu TSC1/2, který v aktivní formě potlačuje aktivitu komplexu mTORc1. Jelikož vliv proteinkináz ERK1/2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES je totožný s iniciací translace, která je závislá na čepičce, usuzujeme, že proteinkinázy ERK1/2 ovlivňují oba děje podobným mechanismem. Nejspíše se jedná o regulaci proteinu nebo proteinů, které se účastní obou jevů. Přesné propojení ERK1/2 s iniciací translace závislé na HCV IRES je nad rámec této práce, avšak může posloužit jako téma pro další výzkum.

Zpětně si uvědomujeme, že některé nedostatky mohly ovlivnit kvalitu a rozptýlit dat. Například jako jednu z chyb vnímáme fakt, že jsme před transfekcemi nepočítali množství buněk. Další problémy mohly nastat při imunodetekcích, kdy jsme nepoužívali kontroly nanášek, tj. imunodetkovat protein, kterým bychom kontrolovali, že jsme do všech jamek na SDS gelové elektroforóze nanесли stejnou koncentraci proteinů. I přesto, že jsme metodou BCA měřili koncentraci proteinů ve

vzorku, je možné, že chybou pipetování došlo k špatnému nanesení, což mohlo ovlivnit intenzitu některých proužků. Nemyslíme si však, že by se chyba projevila do takové míry, ve které by kompletně narušila interpretaci experimentu.

7 Souhrn

V této diplomové práci prezentujeme výsledky experimentů z období 2012-2016, které přispěly k vypracování tématu této práce, tedy objasnění vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES.

RNA interference

- Podařilo se nám zavést metodu RNA interference. Jsme schopni úspěšně zopakovat umlčení exprese cílového genu pomocí molekul siRNA, což se nám podařilo během dalších částí této práce.

Příprava reportérového systému

- Připravili jsme reportérový systém založený na transientní transfekci buněčné linie HEK 293 reportérovými vektory. Vzhledem k problémům s přípravou stabilních linií a nespokojenosti s transfekcí reportérovými molekulami RNA, vnímáme výše zmíněnou možnost jako nejlepší možné řešení.

Objasnění vlivu proteinkináz ERK1 a ERK2 na iniciaci translace závislé na HCV IRES

- Na základě experimentálního přístupu zahrnující předchozí dva body, prezentujeme v této práci naše výsledky. Usuzujeme, že proteinkinázy ERK1 a ERK2 jsou pozitivními regulátory iniciace translace závislé na čepičce i na HCV IRES. Proteinkinázy ERK1 a ERK2 se tak z hlediska regulace iniciace translace chovají jako celková jednotka ERK1/2, kde je důležitost jednotlivých isoform v regulaci tohoto děje odrazem jejich vnitrobuněčného zastoupení.

8 Seznam použité literatury

- Aebbersold DM, Shaul YD, Yung Y *et al.* (2004) Extracellular signal-regulated kinase 1c (ERK1c), a novel 42-kilodalton ERK, demonstrates unique modes of regulation, localization, and function. *Molecular and cellular biology*, **24**, 10000–15.
- Aken BL, Ayling S, Barrell D *et al.* (2016) The Ensembl Gene Annotation System. , 1–19.
- Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y *et al.* (1998) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, **17**, 227–36.
- Ballif BA, Roux PP, Gerber SA *et al.* (2005) Quantitative phosphorylation profiling of the ERK/p90 ribosomal S6 kinase-signaling cassette and its targets, the tuberous sclerosis tumor suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 667–72.
- Banerjee A, Gugasyan R, McMahon M, Gerondakis S (2006) Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**, 3274–3279.
- Berry KE, Waghray S, Doudna JA (2010) The HCV IRES pseudoknot positions the initiation codon on the 40S ribosomal subunit. *RNA (New York, N.Y.)*, **16**, 1559–69.
- Braasch DA, Jensen S, Liu Y *et al.* (2003) RNA interference in mammalian cells by chemically-modified RNA. *Biochemistry*, **42**, 7967–75.
- Bramsen JB, Laursen MB, Nielsen AF *et al.* (2009) A large-scale chemical modification screen identifies design rules to generate siRNAs with high activity, high stability and low toxicity. *Nucleic acids research*, **37**, 2867–81.
- Brtva TR, Drugan JK, Ghosh S *et al.* (1995) Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 9809–9812.

- Buday L, Downward J (1993) Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell*, **73**, 611–620.
- Buscà R, Pouysségur J, Lenormand P (2016) ERK1 and ERK2 Map Kinases: Specific Roles or Functional Redundancy? *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **4**, 1–23.
- Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA *et al.* (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *The Journal of biological chemistry*, **286**, 567–77.
- Casanova CM, Sehr P, Putzker K *et al.* (2012) Automated high-throughput RNAi screening in human cells combined with reporter mRNA transfection to identify novel regulators of translation. *PloS one*, **7**, e45943.
- Casey PJ, Soliski PA, Der CJ, Buss JE (1989) p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 8323–8327.
- Clark-Lewis I, Sanghera JS, Pelech SL (1991) Definition of a consensus sequence for peptide substrate recognition by p44mpk, the meiosis-activated myelin basic protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 15180–15184.
- Consortium TU (2014) Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research*, **42**, D191–198.
- Davidson BL, McCray PB (2011) Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature reviews. Genetics*, **12**, 329–40.
- Dennis PB, Jaeschke A, Saitoh M *et al.* (2001) Mammalian TOR: a homeostatic ATP sensor. *Science (New York, N.Y.)*, **294**, 1102–5.
- Doench JG (2003) siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development*, **17**, 438–442.
- Drugan JK, Khosravi-Far R, White MA *et al.* (1996) Ras interaction with two distinct binding domains in Raf-1 may be required for Ras transformation. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 233–237.

- Dumas E, Staedel C, Colombat M *et al.* (2003) A promoter activity is present in the DNA sequence corresponding to the hepatitis C virus 5' UTR. *Nucleic Acids Research*, **31**, 1275–1281.
- Eiring AM, Harb JG, Neviani P *et al.* (2010) miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, **140**, 652–65.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W *et al.* (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494–8.
- Ellwanger DC, Büttner F a., Mewes HW, Stümpflen V (2011) The sufficient minimal set of miRNA seed types. *Bioinformatics*, **27**, 1346–1350.
- Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature structural & molecular biology*, **15**, 346–353.
- Farci P, Alter HJ, Wong D *et al.* (1991) A Long-Term Study of Hepatitis C Virus Replication in Non-A, Non-B Hepatitis. *New England Journal of Medicine*, **325**, 98–104.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK *et al.* (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806–11.
- Frémin C, Saba-EI-Leil MK, Lévesque K, Ang SL, Meloche S (2015) Functional redundancy of ERK1 and ERK2 MAP kinases during development. *Cell Reports*, **12**, 913–921.
- Furic L, Rong L, Larsson O *et al.* (2010) eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 14134–9.
- Garami A, Zwartkruis FJT, Nobukuni T *et al.* (2003) Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. *Molecular cell*, **11**, 1457–66.

- Gilbert W V. (2010) Alternative Ways to Think about Cellular Internal Ribosome Entry. *Journal of Biological Chemistry*, **285**, 29033–29038.
- Gingras AC, Gygi SP, Raught B *et al.* (1999) Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes & development*, **13**, 1422–37.
- Goujon M, McWilliam H, Li W *et al.* (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, **38**, 695–699.
- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, **466**, 835–40.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, **404**, 293–6.
- Han J, Lee Y, Yeom KH *et al.* (2006) Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell*, **125**, 887–901.
- Hara K, Maruki Y, Long X *et al.* (2002) Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*, **110**, 177–89.
- Hatano N, Mori Y, Oh-hora M *et al.* (2003) Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes to Cells*, **8**, 847–856.
- Herbert TP, Tee AR, Proud CG (2002) The extracellular signal-regulated kinase pathway regulates the phosphorylation of 4E-BP1 at multiple sites. *Journal of Biological Chemistry*, **277**, 11591–11596.
- Hinnebusch AG (2014) The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry*, **83**, 779–812.
- Höck J, Meister G (2008) The Argonaute protein family. *Genome biology*, **9**, 210.
- Honda M, Beard MR, Ping LH, Lemon SM (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *Journal of virology*, **73**, 1165–74.

- Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC *et al.* (1996) Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology*, **222**, 31–42.
- Huez I, Créancier L, Audigier S *et al.* (1998) Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Molecular and cellular biology*, **18**, 6178–90.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE *et al.* (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, **293**, 834–8.
- Choo QL, Richman KH, Han JH *et al.* (1991) Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 2451–5.
- Chuderland D, Konson A, Seger R (2008) Identification and characterization of a general nuclear translocation signal in signaling proteins. *Molecular cell*, **31**, 850–861.
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L (2003) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes & development*, **17**, 1829–34.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J *et al.* (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*, **21**, 635–637.
- Jackson A, Burchard J, Schelter J, Chau B (2006) Widespread siRNA “off-target” transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *Rna*, **12**, 1179–87.
- Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova T V (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **11**, 113–27.
- Jacobs D, Glossip D, Xing H, Muslin AJ, Kornfeld K (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes & development*, **13**, 163–175.

- Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY *et al.* (2010) COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*, **468**, 968–72.
- Kato T, Date T, Miyamoto M *et al.* (2005) Nonhepatic cell lines HeLa and 293 support efficient replication of the hepatitis C virus genotype 2a subgenomic replicon. *Journal of virology*, **79**, 592–596.
- Khawaja A, Vopalensky V, Pospisek M (2015) Understanding the potential of hepatitis C virus internal ribosome entry site domains to modulate translation initiation via their structure and function. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, **6**, 211–224.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, **115**, 209–16.
- Kieft JS, Zhou K, Grech A, Jubin R, Doudna JA (2002) Crystal structure of an RNA tertiary domain essential to HCV IRES-mediated translation initiation. *Nature structural biology*, **9**, 370–4.
- Kieft JS, Zhou K, Jubin R, Doudna JA (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA (New York, N.Y.)*, **7**, 194–206.
- Kim Y-K, Kim VN (2007) Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, **26**, 775–83.
- Kim D-H, Sarbassov DD, Ali SM *et al.* (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, **110**, 163–75.
- Knauf U, Tschopp C, Gram H (2001) Negative regulation of protein translation by mitogen-activated protein kinase-interacting kinases 1 and 2. *Molecular and cellular biology*, **21**, 5500–11.
- Kolch W, Heidecker G, Kochs G *et al.* (1993) Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature*, **364**, 249–52.
- Kolupaeva VG, Pestova T V, Hellen CU (2000) An enzymatic footprinting analysis of the interaction of 40S ribosomal subunits with the internal ribosomal entry site of hepatitis C virus. *Journal of virology*, **74**, 6242–50.

- Komar AA, Hatzoglou M (2005) Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 23425–8.
- Kosako H, Yamaguchi N, Aranami C *et al.* (2009) Phosphoproteomics reveals new ERK MAP kinase targets and links ERK to nucleoporin-mediated nuclear transport. *Nature structural & molecular biology*, **16**, 1026–1035.
- von Kriegsheim A, Baiocchi D, Birtwistle M *et al.* (2009) Cell fate decisions are specified by the dynamic ERK interactome. *Nature Cell Biology*, **11**, 1458–1464.
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF *et al.* (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, **358**, 417–421.
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y *et al.* (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Molecular cell*, **14**, 43–55.
- Leevers SJ, Paterson HF, Marshall CJ (1994) Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, **369**, 411–414.
- Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P (2008) Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Molecular and cellular biology*, **28**, 511–27.
- Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P (2009) Total ERK1/2 activity regulates cell proliferation. *Cell cycle*, **8**, 705–711.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology*, **7**, 719–23.
- Lloyd AC (2006) Distinct functions for ERKs? *Journal of biology*, **5**, 13.
- Locker N, Easton LE, Lukavsky PJ (2007) HCV and CSFV IRES domain II mediate eIF2 release during 80S ribosome assembly. *The EMBO journal*, **26**, 795–805.

- Lund E, Dahlberg JE (2006) Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **71**, 59–66.
- Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, **303**, 95–8.
- MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson C V., Doudna JA (2008) In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105**, 512–517.
- Marchi M, D'Antoni A, Formentini I *et al.* (2008) The N-terminal domain of ERK1 accounts for the functional differences with ERK2. *PloS one*, **3**, e3873.
- Matsuda S, Kosako H, Takenaka K *et al.* (1992) Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *The EMBO journal*, **11**, 973–982.
- Matthews JC, Hori K, Cormier MJ (1977) Purification and properties of Renilla reniformis luciferase. *Biochemistry*, **16**, 85–91.
- Mazzucchelli C, Vantaggiato C, Ciamei A *et al.* (2002) Knockout of ERK1 MAP kinase enhances synaptic plasticity in the striatum and facilitates striatal-mediated learning and memory. *Neuron*, **34**, 807–820.
- McWilliam H, Li W, Uludag M *et al.* (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic acids research*, **41**, 597–600.
- Meister M, Tomasovic A, Banning A, Tikkanen R (2013) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount. *International journal of molecular sciences*, **14**, 4854–4884.
- Moriya K, Fujie H, Shintani Y *et al.* (1998) The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nature Medicine*, **4**, 1065–1067.
- Morrison DK, Heidecker G, Rapp UR, Copeland TD (1993) Identification of the major phosphorylation sites of the Raf-1 kinase. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 17309–17316.

- Murata T, Hijikata M, Shimotohno K (2005) Enhancement of internal ribosome entry site-mediated translation and replication of hepatitis C virus by PD98059. *Virology*, **340**, 105–115.
- Nebreda AR, Hill C, Gomez N, Cohen P, Hunt T (1993) The protein kinase mos activates MAP kinase kinase in vitro and stimulates the MAP kinase pathway in mammalian somatic cells in vivo. *FEBS letters*, **333**, 183–7.
- Nekrasova T, Shive C, Gao Y *et al.* (2005) ERK1-Deficient Mice Show Normal T Cell Effector Function and Are Highly Susceptible to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology*, **175**, 2374–2380.
- Ngo HTT, Pham L V, Kim J-W, Lim Y-S, Hwang SB (2013) Modulation of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3 by hepatitis C virus core protein. *Journal of virology*, **87**, 5718–31.
- Notredame C, Higgins DG, Heringa J (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of molecular biology*, **302**, 205–217.
- Odreman-Macchioli F, Baralle FE, Buratti E (2001) Mutational analysis of the different bulge regions of hepatitis C virus domain II and their influence on internal ribosome entry site translational ability. *The Journal of biological chemistry*, **276**, 41648–55.
- Okuda M, Li K, Beard MR *et al.* (2002) Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology*, **122**, 366–75.
- Pagès G, Guérin S, Grall D *et al.* (1999) Defective thymocyte maturation in p44 MAP kinase (Erk 1) knockout mice. *Science (New York, N.Y.)*, **286**, 1374–7.
- Payne DM, Rossomando AJ, Martino P *et al.* (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *The EMBO journal*, **10**, 885–892.

- Plotnikov A, Chuderland D, Karamansha Y, Livnah O, Seger R (2011) Nuclear extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 translocation is mediated by casein kinase 2 and accelerated by autophosphorylation. *Molecular and cellular biology*, **31**, 3515–3530.
- Příbyl M (2014) ERK1/2 MAP kinase – structure and interaction partners. *Bachelor thesis*.
- Qi LS, Larson MH, Gilbert LA *et al.* (2013) Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152**, 1173–1183.
- Ray LB, Sturgill W (1988) Characterization of Insulin-stimulated Microtubule-associated Protein Kinase. , 12721–12727.
- Rijnbrand R, Bredenbeek P, van der Straaten T *et al.* (1995) Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS letters*, **365**, 115–9.
- Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N (1996) Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 1065–70.
- Sancak Y, Peterson TR, Shaul YD *et al.* (2008) The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*, **320**, 1496–501.
- Seger R, Ahn NG, Posada J *et al.* (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 14373–14381.
- Shi Y, Sharma A, Wu H, Lichtenstein A, Gera J (2005) Cyclin D1 and c-myc internal ribosome entry site (IRES)-dependent translation is regulated by AKT activity and enhanced by rapamycin through a p38 MAPK- and ERK-dependent pathway. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 10964–73.

- Shindo Y, Iwamoto K, Mouri K *et al.* (2016) Conversion of graded phosphorylation into switch-like nuclear translocation via autoregulatory mechanisms in ERK signalling. *Nature communications*, **7**, 10485.
- Sievers F, Wilm A, Dineen D *et al.* (2011) Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, **7**, 539.
- Sizova D V, Kolupaeva VG, Pestova T V, Shatsky IN, Hellen CU (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *Journal of virology*, **72**, 4775–82.
- Songyang Z, Lu KP, Kwon YT *et al.* (1996) A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Molecular and cellular biology*, **16**, 6486–6493.
- Spriggs KA, Cobbold LC, Jopling CL *et al.* (2009) Canonical initiation factor requirements of the Myc family of internal ribosome entry segments. *Molecular and cellular biology*, **29**, 1565–74.
- Sternberg SH, Redding S, Jinek M, Greene EC, Doudna JA (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, **507**, 62–7.
- Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K *et al.* (1992) Biphasic activation of two mitogen-activated protein kinases during the cell cycle in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 20293–7.
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nature cell biology*, **2**, 110–116.
- Tee AR, Manning BD, Roux PP, Cantley LC, Blenis J (2003) Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Current biology: CB*, **13**, 1259–68.

- Tommaso P Di, Moretti S, Xenarios I *et al.* (2011) T-Coffee: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. *Nucleic acids research*, **39**, W13–W17.
- Topisirovic I, Ruiz-Gutierrez M, Borden KLB (2004) Phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E contributes to its transformation and mRNA transport activities. *Cancer research*, **64**, 8639–42.
- Trahey M, McCormick F (1987) A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, **238**, 542–545.
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K *et al.* (2002) Alteration of intrahepatic cytokine expression and AP-1 activation in transgenic mice expressing hepatitis C virus core protein. *Virology*, **304**, 415–24.
- Tsutsumi T, Suzuki T, Moriya K *et al.* (2003) Hepatitis C virus core protein activates ERK and p38 MAPK in cooperation with ethanol in transgenic mice. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, **38**, 820–8.
- Ueda Y, Hirai SI, Osada SI *et al.* (1996) Protein kinase C ?? activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and dependent on Raf. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 23512–23519.
- Ueda T, Watanabe-Fukunaga R, Fukuyama H, Nagata S, Fukunaga R (2004) Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E but not for cell growth or development. *Molecular and cellular biology*, **24**, 6539–49.
- Urano J, Comiso MJ, Guo L *et al.* (2005) Identification of novel single amino acid changes that result in hyperactivation of the unique GTPase, Rheb, in fission yeast. *Molecular microbiology*, **58**, 1074–86.
- Vogel US, Dixon RA, Schaber MD *et al.* (1988) Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature*, **335**, 90–93.
- Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA (1993) Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell*, **74**, 205–214.

- Vomastek T, Iwanicki MP, Burack WR *et al.* (2008) Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) phosphorylation sites and docking domain on the nuclear pore complex protein Tpr cooperatively regulate ERK2-Tpr interaction. *Molecular and cellular biology*, **28**, 6954–66.
- Vopálenský V, Masek T, Horváth O *et al.* (2008) Firefly luciferase gene contains a cryptic promoter. *RNA (New York, N.Y.)*, **14**, 1720–1729.
- Wang X, Flynn A, Waskiewicz AJ *et al.* (1998) The phosphorylation of eukaryotic initiation factor eIF4E in response to phorbol esters, cell stresses, and cytokines is mediated by distinct MAP kinase pathways. *The Journal of biological chemistry*, **273**, 9373–7.
- Wang C, Sarnow P, Siddiqui A (1994) A conserved helical element is essential for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *Journal of virology*, **68**, 7301–7.
- Waskiewicz a J, Johnson JC, Penn B *et al.* (1999) Phosphorylation of the cap-binding protein eukaryotic translation initiation factor 4E by protein kinase Mnk1 in vivo. *Molecular and cellular biology*, **19**, 1871–1880.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A *et al.* (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, **453**, 539–43.
- Wendel HG, Silva RLA, Malina A *et al.* (2007) Dissecting eIF4E action in tumorigenesis. *Genes and Development*, **21**, 3232–3237.
- Whitehurst AW, Wilsbacher JL, You Y *et al.* (2002) ERK2 enters the nucleus by a carrier-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 7496–7501.
- Wood K V, de Wet JR, Dewji N, DeLuca M (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochemical and biophysical research communications*, **124**, 592–6.
- Yao Y, Li W, Wu J *et al.* (2003) Extracellular signal-regulated kinase 2 is necessary for mesoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12759–64.

- Yazicioglu MN, Goad DL, Ranganathan A *et al.* (2007) Mutations in ERK2 binding sites affect nuclear entry. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 28759–67.
- Yilmazel B, Hu Y, Sigoillot F *et al.* (2014) Online GESS: prediction of miRNA-like off-target effects in large-scale RNAi screen data by seed region analysis. *BMC bioinformatics*, **15**, 192.
- Yoon S, Seger R (2006) The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors*, **24**, 21–44.
- Zhang XF, Settleman J, Kyriakis JM *et al.* (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, **364**, 308–313.
- Zhou T, Sun L, Humphreys J, Goldsmith EJ (2006) Docking interactions induce exposure of activation loop in the MAP kinase ERK2. *Structure*, **14**, 1011–1019.
- Zuberek J, Wyslouch-Cieszynska A, Niedzwiecka A *et al.* (2003) Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with mRNA 5' cap analogs by electrostatic repulsion: intein-mediated protein ligation strategy to obtain phosphorylated protein. *RNA (New York, N.Y.)*, **9**, 52–61.